

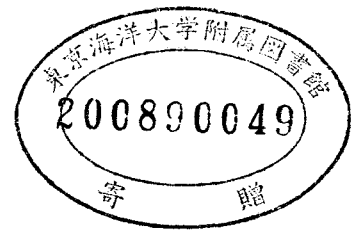
# 魚類抗酸菌症に対するワクチン開発のための研究

著者	加藤 豪司
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2007
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1342/00000906/">http://id.nii.ac.jp/1342/00000906/</a>

修士学位論文

魚類抗酸菌症に対する  
ワクチン開発のための研究

平成 19 年度  
(2008 年 3 月)



東京海洋大学大学院  
海洋科学技術研究科  
海洋生命科学専攻  
加藤 豪司

# 目次

## 第一章 序論

第 1 節	<i>Mycobacterium</i> sp.感染症	1
第 2 節	<i>Mycobacteria</i> 感染時における哺乳動物宿主の免疫応答	3
第 3 節	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacille de Calmette et Guérin	5
第 4 節	ツベルクリン反応	7
第 5 節	DNA ワクチンの <i>Mycobacteriosis</i> および魚類への応用	9
第 6 節	<i>Mycobacterium</i> 属細菌の主要抗原 Antigen 85 複合体遺伝子	11
第 7 節	本研究の目的	12

## 第二章 実験方法

第 1 節	Ag85 複合体遺伝子をエピトープとする DNA ワクチンの ブリ属ミコバクテリウム症に対する効果	13
第 2 節	<i>Mycobacterium</i> sp.に対するワクチン接種後の ヒラメにおける自然免疫応答	23
第 3 節	<i>Mycobacterium</i> sp. 012971 株由来 purified protein derivative 刺激による ワクチン接種魚の免疫応答	27

## 第三章 実験結果

第 1 節	Ag85 複合体遺伝子をエピトープとする DNA ワクチンの ブリ属ミコバクテリウム症に対する効果	42
第 2 節	<i>Mycobacterium</i> sp.に対するワクチン接種後の ヒラメにおける自然免疫応答	45
第 3 節	<i>Mycobacterium</i> sp. 012971 株由来 purified protein derivative 刺激による ワクチン接種魚の免疫応答	46

第四章	考察	73
-----	----	----

謝辞	77
----	----

参考文献	78
------	----

[博士前期課程]

## 修士学位論文内容要旨

論文題目 専攻 海洋生命科学  
魚類抗酸菌症に対するワクチン開発のための研究 氏名 加藤 豪司

近年、日本国内のブリ類養殖場において魚類抗酸菌症が発生し、経済的被害を及ぼしている。本感染症の原因菌である *Mycobacterium* sp. は宿主の細胞内に寄生することから、罹病魚への薬剤投与による化学療法では効果が限定される。このようなことから本感染症に対するワクチンの開発が望まれている。ワクチン開発においてワクチンの有効性の評価は、感染試験により検討するが、充実した飼育設備を必要とすることなどから、より簡便に行える実験方法が求められる。そこで、本研究では魚類抗酸菌症に対するワクチンの開発を目的として、数種のワクチン候補を用いた感染実験を行うとともに、これらに対する宿主の免疫応答を指標としてワクチンの評価を試みた。

*Mycobacterium* 属細菌の主要抗原である Antigen85 複合体遺伝子を *Mycobacterium* sp. 012971 株よりクローニングし、DNA ワクチンを作製した。これをブリ稚魚またはカンパチ稚魚に接種し、4 週間飼育した後、*Mycobacterium* sp. 012971 株を用いて攻撃試験を行った。本試験では、累積死亡率にワクチン区と対照区との差は見られず、ワクチン効果は認められなかった。

次に、ワクチン候補として *M. bovis* BCG（ヒト肺結核症のワクチン）生菌、*Mycobacterium* sp. 012971 株のホルマリン死菌（FKC）および Ag85 複合体遺伝子を含む DNA ワクチンを用い、接種後の免疫応答を遺伝子レベルで解析した。BCG および FKC を接種したヒラメは、炎症性サイトカイン（インターロイキン（IL） $-1\beta$ 、IL-6 および主要壊死因子（TNF） $\alpha$ ）の腎臓における mRNA 蓄積量が対照区と比べ大きく上昇していた。さらに、ワクチン接種後 4 週目に抗原による刺激を行い、同様に解析を行ったところ、BCG 接種したヒラメの腎臓において炎症性サイトカインの mRNA 蓄積量上昇がみられた。また、FKC および BCG ワクチンを接種したヒラメの抗原に対する応答をヒラメ cDNA マイクロアレイで解析したところ、両者の遺伝子発現パターンには大きな差があることが明らかとなった。これらのことから、BCG ワクチンは *Mycobacterium* sp. に対する細胞性免疫を誘導することが示唆され、魚類抗酸菌症に対するワクチン効果が期待された。

# 第一章 序論

## 第1節 *Mycobacterium* sp.感染症

*Mycobacterium* 属細菌は、グラム陽性、好気性、抗酸性の短桿菌で、哺乳類、鳥類をはじめとする様々な生物種に対して感染症を引き起こす。代表的な種としてヒト肺結核を引き起こす *Mycobacterium tuberculosis*、ハンセン病の原因菌 *M. leprae*、鳥型結核菌 *M. avium* などが挙げられるが、魚類においてもその感染症は淡水、汽水および海水を問わず広範に発生してきた。魚類 *Mycobacterium* 感染症の原因菌は主に、*M. marinum*<sup>(1)</sup>、*M. fortuitum*<sup>(2)</sup>および *M. chelonae*<sup>(4)</sup>が挙げられるが、これらの変異株やシノニムと考えられる菌株によるものも多く、すべての魚種に感受性があると言われている<sup>(3)</sup>。*M. marinum* および *M. fortuitum* は熱帯魚から分離されたように、熱帯もしくは比較的温暖な水域で罹病魚が見られる。一方で、*M. chelonae* 感染症は太平洋サケ (*Salmo salar*) において流行したように比較的寒冷な水域で発生するが、培養の難しさから分離は後年までなされなかった<sup>(5)</sup>。

日本では、*Mycobacterium* sp.による感染症が1985年秋から1986年春にかけて、高知県宿毛湾のブリ養殖場で初めて報告された。感染魚には、血液の混ざった腹水の貯留、各臓器の癒着、腎臓や脾臓の肥大および粟粒結節の形成等の症状が見られ、病巣から分離された菌は1%小川培地もしくはMiddlebrook 7H10B平板培地上に黄白色で不定形のコロニーを形成する。本菌は、*M. marinum* と近縁の種と考えられているが、37℃で発育しないことや、ピクリン酸耐性、亜硝酸ナトリウム耐性、メチルバイオレット耐性など多くの性状で違いが見受けられ、既存の菌とは異なる新種の *Mycobacterium* 属細菌として分類された<sup>(6)</sup>。しかしながら、現在までに種小名の検討はなされておらず、*Mycobacterium* sp.として扱われている<sup>(7)</sup>。また、1993年には原因菌がブリミコバクテリウム症の同一の種であると考えられる疾病が東京都内の養殖シマアジにおいても発生している<sup>(8)</sup>。

病原性 *Mycobacterium* は宿主の細胞内に寄生することが解明されている。体内に侵入した病原微生物は、最初に宿主の自然免疫機構に認識され、マクロファージを中心とした貪食細胞により非特異的にファゴソーム内に取り込まれる。*Mycobacteria* の取

り込みには、マクロファージ細胞表面に存在する補体レセプター (CRs)、マンノースレセプター、免疫グロブリン定常領域 (Fc) レセプターおよびスカベンジャーレセプターなどが関与する<sup>(9)</sup>。特に CR3 は、*in vitro* で抗 CR3 抗体等によって阻害されるとマクロファージの *Mycobacteria* 取り込みが抑制されることから、重要であるとされている<sup>(10)</sup>。病原微生物が宿主細胞のレセプター分子に結合すると、細胞膜は陥没し始め、病原微生物を含んだ小胞であるファゴソームが形成されて、貪食が起こる。貪食された生体外異物が非病原性細菌であれば、ファゴソーム形成時に産生される活性酸素、過酸化水素およびヒドロキシラジカル等により殺菌される。しかし、*Mycobacteria* はスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼ等のスカベンジャー活性により活性酸素を無毒化することができ、殺菌を回避する<sup>(11)</sup>。

細胞内に取り込まれた後、生体外異物を含んだファゴソームはリソソームと融合 (ファゴソームの成熟) して、これら「積荷」を分解し完全に排除するが、*Mycobacteria* は、このステップを阻害することで生存に適した環境を作り上げる。宿主側の生体分子である colonin 1<sup>(12)</sup>,<sup>(13)</sup> や phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P)<sup>(14)</sup> は、*Mycobacteria* 感染によってその挙動が変化し、結果としてファゴソームの成熟阻害に関与する。一方で、細菌側の阻害因子も明らかにされてきている。*Mycobacteria* の細胞壁成分である glycosylated phosphatidylinositol lipoarabinomannan (ManLAM) は PI3P のアナログであり、PI3P 依存的なファゴソーム成熟の経路を阻害する。また、protein kinase G は、細菌細胞外に分泌され、さらにはファゴソーム外に分泌されることでファゴソームとリソソームの会合を阻害する<sup>(15)</sup>。これらの結果、貪食細胞はその内部で *Mycobacteria* を殺菌、分解することができず、最終的には細菌の分散を押さえ込むために肉芽腫や結節を形成する。

このように *Mycobacteria* は細胞内に寄生できることから、抗生物質等を用いた化学療法は効果が限定される。試験管内においては、リファンピシリン、ストレプトマイシンおよびエリスロマイシンに対する本菌の最小発育濃度および最小殺菌濃度は低く、これらの薬剤は有効であることが示された<sup>(16)</sup>。しかし、*Mycobacterium* sp. 罹病ブリに対して比較的有効と考えられるリファンピシリンを投与しても菌が体内に残存してしまう<sup>(17)</sup>。そのため、薬剤投与による治療には経費が非常にかかり、現状では保菌魚や病魚の搬入防止、病魚の早期発見および焼却処理の徹底、漁具の消毒などの予防策をとるほかに対処法はない<sup>(18)</sup>。また、薬剤の多用によって多剤耐性菌の出現も懸念されることから、ワクチンの開発が強く求められている。

## 第2節 Mycobacteria 感染時における哺乳動物宿主の免疫応答

第1節で示したとおり、Mycobacteria は自然免疫応答による非特異的な貪食では殺菌および消化されないが、こうした細胞内寄生体に対して宿主は特異的な細胞性免疫を獲得し、感染に対処する。

体内に侵入してきた *M. tuberculosis* はマクロファージや樹状細胞に貪食される一方で、それらの細胞表面に存在する Toll-like receptor (TLR) 2 により認識される。TLR2 によるシグナルは Myd88、IRAK、TRAF、IKK などの細胞内シグナル伝達を介して NF- $\kappa$ B 転写因子の活性化を誘導し<sup>(19)</sup>、炎症性サイトカインが産生され菌進入部位に炎症が起こる。一方で、同様のシグナル伝達において抗炎症作用のあるサイトカイン IL-10 も誘導され、過剰な炎症作用に対してフィードバック効果を示す<sup>(20)</sup>。さらに、TLR シグナルの下流に存在する Myd88 のノックアウトマウスは Th1 系の免疫応答を誘導できるものの、*M. tuberculosis* 感染での致死性が高まることが報告された<sup>(21)</sup>。このことから TLR 依存的な自然免疫応答は *M. tuberculosis* 感染に対して非常に重要であり、この後に起こる獲得免疫への移行に大きな役割を果たしていることが示唆されている。

これら TLR 依存的な免疫応答の後には、*M. tuberculosis* を取り込んだ抗原提示細胞による抗原提示がおこる。最近の研究結果からは、流入領域リンパ節への抗原運搬が *M. tuberculosis* の抗原を取り込んだ樹状細胞 (DCs) のみで行われ、それにより Th1 系の免疫応答が引き起こされることが明らかにされた<sup>(22)</sup>。この時 *M. tuberculosis* を取り込んだ DCs は Th1 細胞に対して抗原提示を行い、Th1 細胞は感染部位へ移動してインターフェロン (IFN) - $\gamma$  やインターロイキン (IL) -2 等のサイトカインを産生し、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の分化、活性化やマクロファージの活性化が起こる。活性化されたマクロファージおよび特異的 CTL は Th1 細胞、DCs および B 細胞とともに *M. tuberculosis* に細胞内寄生された貪食細胞を取り囲むようにして集合し、繊維芽細胞が周囲を覆うことで肉芽腫が形成される。しかしながら、この免疫病理学的な応答が *M. tuberculosis* 感染の特徴となり菌の生体内転移や拡散を防ぐ一方で、炎症の局在化やそれによる肺細胞への攻撃が起こってしまい<sup>(22)</sup>、宿主にとっては致命的な病状となってしまう。

一方で、IFN- $\gamma$  は、マクロファージを活性化しファゴソームにおける酸化能の上昇や、阻害されていたファゴソーム-リソソーム融合を促進することで *M. tuberculosis*

の細胞内残存に対して抵抗力を付与する<sup>(23), (24)</sup>。しかしながら、近年の研究成果によると IFN- $\gamma$  を中心とした免疫的な圧力を加えることで、*M. tuberculosis* は潜伏期遺伝子を発現するようになることが明らかにされた。トランスポゾン変異を用いた方法により、IFN- $\gamma$  産生による圧力がかかった際に、3 つの遺伝子が *M. tuberculosis* の生体内における発育に重要であることがわかった<sup>(25)</sup>。さらに、重症免疫不全マウスにおいては発現されないが、免疫的に正常なマウス感染下では発現が見られる遺伝子が *M. tuberculosis* において発見されている<sup>(26)</sup>。これらの遺伝子は *M. tuberculosis* の細胞内潜伏に必要となり、宿主の免疫力低下とともに再活性化するための鍵となる。

的確な免疫応答が結果的に潜伏感染を引き起こしてしまうが、*M. tuberculosis* の再活性化を防ぐには、肉芽腫内の免疫的な環境を維持することが重要となり、主要壊死因子 (TNF) - $\alpha$  の関連が近年明らかにされてきている。現在、100 万人以上のリウマチ性関節炎患者が TNF 中和治療を受けているが、この時に合併症として頻繁に引き起こされる病状が日和見感染と *M. tuberculosis* の再活性化による肺結核である。また、抗 TNF 抗体もしくは可溶性 TNF 受容体の接種により潜伏感染を再活性化させる<sup>(27)</sup>。このことから予想されるとおり、ヒトで通常に働いている免疫機構では、*M. tuberculosis* の抑制はできるものの根絶は不可能であり、TNF は菌の封じ込めに重要であることが示唆される<sup>(27)</sup>。また、CD4<sup>+</sup> T 細胞、nitric oxide synthase 2 (NOS2) 等も潜伏感染時における *M. tuberculosis* の制御に関わっている<sup>(28)</sup>。

以上のように、Mycobacteria 感染後の化学療法では、菌の増殖、転移を抑制するが潜伏感染および菌の再活性化のリスクを負うことになる。そこで、感染暦を持つ以前に、ワクチンによって Mycobacteria に対する特異的免疫を獲得することが重要である。



### 第3節 *Mycobacterium bovis* Bacille de Calmette et Guérin

*M. tuberculosis* 感染症である肺結核は、もっとも早くワクチンが開発された感染症でもある<sup>(29)</sup>。19世紀の終わりのころ、Robert Kochにより肺結核の原因菌が *M. tuberculosis* であることが明らかにされた。また、Kochは滅菌した *M. tuberculosis* 培養濾液をワクチンとして使用することを試み、ワクチンとしての効果は見出せなかったものの、炎症反応を誘導することを発見した。Kochの現象として知られるこの反応は後に、炎症性サイトカインの過剰分泌が原因であることがわかり、特に TNF- $\alpha$  が関与していることが明らかにされた<sup>(30)</sup>。

そのようななか、パスツール研究所の Albert Calmette と Camille Guérin によって肺結核に対するワクチン *Mycobacterium bovis* Bacille de Calmette et Guérin (BCG) が開発された<sup>(29)</sup>。彼らは *M. tuberculosis* の近縁種であるウシ型結核菌 *M. bovis* を試験管上の培地において13年間、230代に渡り継代し、動物実験による菌の弱毒化を観察してワクチンとしての利用を試みた。1921年にはこのワクチンを乳児に接種して、死亡率を90%も減少させる大成功を収めた。その後何十年もの間、安全性が高いことと安価なことから、世界中でもっとも用いられるワクチンとなった。先進国ではBCGワクチンの効果は絶大であり、ヨーロッパや日本では肺結核の流行は終焉を迎えた<sup>(31)</sup>。しかしながら、発展途上国における肺結核の大流行に対してはまったく効果を示さない場合もあり、ワクチンの効果については不明な点も多く残っていた。

近年ではBCGワクチン接種に関するメタアナリシスが行われており<sup>(32)</sup>、未だ完全ではないものの、この疑問も明らかにされてきている。第一に、BCGワクチンの効果は短命であり、長くても接種後10~20年程度でその効果は失われてしまうこと<sup>(33)</sup>、<sup>(34)</sup>、<sup>(35)</sup>、第二に、すでに *M. tuberculosis* に対する免疫を持っている集団に対してはまったく効果を示さないことが挙げられる<sup>(36)</sup>、<sup>(37)</sup>。これらのことから、*M. tuberculosis* に対して感染暦を持たない幼児期にBCGワクチン接種を行い、再度ブースター効果を得るためのBCGワクチン接種を行う方法が考案され、さらには、より長期に渡り効果を持続できる新規ワクチンを開発することが今後の研究課題となっている<sup>(38)</sup>。現在では、ワクチニアウイルス Ankara-expressing Ag85A をBCG接種後にブースターとして用いる方法<sup>(39)</sup>、<sup>(40)</sup>についてPhase IIの臨床試験が行われている。また、72 f fusion protein<sup>(41)</sup>、ESAT-6-85B fusion<sup>(42)</sup>のサブユニットワクチンおよびAg85Bを過剰に産生する組換え菌株 rBCG30<sup>(43)</sup>についてPhase Iの臨床試験が行われている。

インフルエンザウイルスや破傷風に対して用いられる不活化ワクチンと異なり、BCG ワクチンのような弱毒化生ワクチンは弱毒化された菌体が宿主に対して弱い感染を引き起こすことにより、液性免疫のみならず細胞性免疫をも同時に誘導できる。*M. tuberculosis* 感染に対して *M. bovis* の弱毒化菌株 BCG がワクチンとして有効であることから、その交差的な抗原の存在が示唆されるが、近年では *Mycobacteria* のもつ細胞壁由来の脂質に対しても特異的な免疫応答が起こることが明らかにされた<sup>(44)</sup>。一般的に、病原体に対する特異的な獲得免疫は、Major histocompatibility complex (MHC) にコードされた抗原提示分子により提示されるペプチド抗原に依存する。しかしながら、ヒトグループ 1 CD1 分子 (CD1a、CD1b、CD1c) は非タンパク質抗原である脂質を結合し、T 細胞に提示することで特異的な免疫応答を誘導する新しいタイプの抗原提示分子である<sup>(45), (46), (47)</sup>。また、CD1 分子により提示されたミコール酸を特異的に認識して活性化する T 細胞の存在が明らかにされ<sup>(48)</sup>、さらにはリポアラビノマンナンの提示により活性化する CD1 拘束性 T 細胞の存在も確認された<sup>(49)</sup>。BCG ワクチン接種を乳児期に受けた成人の血液を BCG 感染樹状細胞により再刺激すると、特異的な CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞が誘導される<sup>(50)</sup>。この際、CD4 陽性 T 細胞の BCG 感染樹状細胞に対する反応は BCG 由来タンパク質を標的としたものであり、一方 CD8 陽性 T 細胞の BCG 感染樹状細胞に対する反応は BCG 由来脂質を標的としたものであった<sup>(44), (50)</sup>。これらのことから、BCG 接種によって誘導される結核免疫は、タンパク質抗原に対する MHC クラス II 拘束性の CD4 陽性 T 細胞の応答と脂質由来の抗原に対する CD1 拘束性の CD8 陽性 T 細胞の応答による相乗的な効果であることが考えられる<sup>(50)</sup>。

## 第4節 ツベルクリン反応

ツベルクリンは1890年に Robert Koch により *M. tuberculosis* の培養液を滅菌し濾過することで創製された。始めはワクチンとしての効果を狙ったものであったが、現在では結核菌感染の有無を検査する方法として広く用いられている。

Koch により創製されたツベルクリンは、旧ツベルクリン (old tuberculin, OT) と呼ばれ、結核菌を 6~8 週間培養した無タンパク合成液体培地を加熱滅菌した後に、濾過し菌体を取り除いて、濃縮したものを適宜に希釈 (通常 2000 倍) してから用いられていた (日本ピーシージーサプライホームページ、<http://www.bcgs.net/contents/faq/faq02.html>)。しかし、このようにして調製した OT は培地成分、菌の代謝産物、菌の自己融解成分などの雑多な成分を含有しており、引き続き抗原活性物質のみを純化抽出する努力が行われたが、活性を有するタンパク (purified protein derivative, PPD) が精製され、これがその後、製法の改良を受けて広くツベルクリン検査に用いられるようになった<sup>(51), (52)</sup>。

ツベルクリン検査は、PPD を左右前腕屈側皮内に接種し、48 時間後に接種部位の発赤、二重発赤、硬結、水疱および壊死について観察し、判定する。日本では、1995 年に検査基準が改定され、反応部位の直径が 0-9mm ならば陰性、10mm 以上で陽性 (弱陽性：発赤のみ、中等度陽性：発赤に硬結を伴う、強陽性：硬結に二重発赤、水疱、壊死を伴う) と区分される<sup>(53)</sup>。ツベルクリン反応を調べる目的は、わが国の場合、1)結核感染を診断して、既感染者には予防投薬や精密検査を、未感染者には BCG 接種を行う、2)BCG 接種の技術評価を行う、3)結核と他疾患との鑑別診断、4)癌患者などの免疫機能の評価が主なものである<sup>(54)</sup>。

ツベルクリン反応は、IV型アレルギー (遅延型アレルギー) を応用した検査法である。これは、細胞性免疫の過剰反応であり、細胞傷害性 T 細胞および活性化マクロファージによる細胞障害の結果、発赤、硬結などの炎症が起こる。結核免疫保持者の皮内にツベルクリン (PPD) を接種すると、血管内を循環している結核感作リンパ球 (CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞) が抗原タンパク質を認識する。すると、リンパ球からサイトカインが分泌されて、活性化マクロファージを誘導するとともに、炎症反応が生じる<sup>(55)</sup>。Tree らは、Guinea Pig の免疫関連遺伝子をスポットしたオリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて、ツベルクリン反応時における遺伝子発現の網羅的な解析を行った<sup>(56)</sup>。その結果、Th1 系サイトカインである IFN- $\gamma$ 、インターロイ

キン（IL）-2 等の発現上昇に加えて、炎症性サイトカインの発現上昇をも確認され、炎症性サイトカインの定量によるツベルクリン反応の評価も可能であることが示唆されている<sup>(56)</sup>。

## 第5節 DNA ワクチンの Mycobacteriosis および魚類への応用

DNA ワクチンは、宿主生物内で認識されるプロモーター配列の下流に抗原遺伝子を組み込んだプラスミド DNA である。宿主体内に組換えプラスミドを投与することで抗原タンパク質が産生されてワクチン作用を有するようになるが、この DNA ワクチンが開発される以前からウイルスの染色体 DNA を宿主細胞内に導入すると、ウイルス性タンパク質が産生され、それに対する抗体が宿主内で作られることが明らかとなっていた。1980 年代にはヒトの遺伝子治療において、導入した DNA からタンパク質が産生され、それが抗原として認識されることが明らかとなった<sup>(57)</sup>。さらに 90 年代には遺伝子治療において、接種 DNA に対して抗体が作られることを利用したワクチンの開発を試みるようになった<sup>(58), (59)</sup>。今日では、げっ歯類や霊長類を用いて研究が進んでおり、インフルエンザウイルス<sup>(60)</sup>、エイズウイルス<sup>(61)</sup>、ヘルペスウイルス<sup>(62)</sup>、およびマラリア原虫<sup>(63)</sup>に対する DNA ワクチンの臨床試験が行われている。

DNA ワクチンは、遺伝子銃や注射を用いて宿主の筋肉へ接種され<sup>(64)</sup>、筋肉細胞内において効率的に抗原タンパク質を産生できる<sup>(65)</sup>。このような方法によって宿主筋肉細胞内に導入された DNA ワクチンは核内に移行して転写、翻訳され抗原タンパク質が産生される。その後、産生されたタンパク質は小胞体内に取り込まれペプチドに分解されてから MHC class I によって抗原提示されるか、細胞外へ分泌される<sup>(66)</sup>。筋肉細胞表面に MHC class I によって抗原提示されたペプチドは、CD8 陽性 T 細胞によって認識され<sup>(66)</sup>、抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞の誘導が起こる<sup>(66)</sup>。一方で、分泌された抗原タンパク質は、抗原提示細胞（マクロファージ、樹状細胞など）に貪食され、MHC class II 分子と結合して CD4 陽性 T 細胞に対して抗原提示される<sup>(67)</sup>。また、その抗原に特異的な B 細胞に取り込まれることでも MHC class II による抗原提示が起こり、CD4 陽性 T 細胞により抗原が認識される。抗原提示を受けたことで CD4 陽性 T 細胞が、Th1 系に傾けば IL-2、IFN- $\gamma$  等のサイトカインが産生され、細胞傷害性 T 細胞およびマクロファージの分化、活性化を誘導する。逆に、Th2 系に傾けば IL-4、IL-13 等のサイトカインが産生され B 細胞の増殖や形質細胞への分化が促進され、抗体の産生が促進される。筋肉細胞内に取り込まれた DNA ワクチンは、CD8 陽性 T 細胞の誘導を優先的に行い、細胞傷害性 T 細胞の強い誘導が特徴となる<sup>(68)</sup>。一方で直接プラスミド DNA を樹状細胞に導入すると、CD4 陽性および CD8 陽性の両 T 細胞に対して抗原をクロスプレゼンテーションすることができる<sup>(68)</sup>。

近年、DNA ワクチンが注目されるようになったのは、この新たなタイプのワクチンが細胞性免疫を誘導できる安全かつ安価なワクチンであることに他ならない。弱毒化ワクチンとしては、前述の BCG ワクチンのほか、麻疹、流行性耳下腺炎および風疹の三種混合ワクチン（日本未承認）がある。これらのワクチンは細胞性免疫を誘導することができるものの、副作用や毒性の復帰など潜在的な危険性が否定できない。一方で、インフルエンザ、狂犬病、コレラなどで用いられている不活化ワクチンや、組換えタンパク質ワクチン（サブユニットワクチン）は細胞性免疫を付与できないため、細胞内寄生対に対しては効果が限定されてしまう<sup>(69)</sup>。細胞内寄生体である結核菌 *M. tuberculosis* に対しては、BCG ワクチンが唯一の予防法として用いられているが、このような特徴から DNA ワクチンの実用化に向けた研究が進められている。抗原遺伝子としては、HSP60<sup>(70)</sup>、ESAT-6<sup>(71)</sup>、MBP83<sup>(72)</sup>、Antigen85 複合体遺伝子<sup>(73)</sup>などが用いられており、その有効性が証明された。現在人に対する DNA ワクチン開発における研究では、プラスミド DNA の細胞内への導入効率、抗原タンパク質の細胞内生産効率の改善、抗原の組み合わせ、DNA ワクチンと組換えタンパク質の組み合わせ、BCG と DNA ワクチンの組み合わせ、DNA ワクチンをウイルスベクターに組み込む方法などによる効果の上昇が試みられている<sup>(68)</sup>。

魚類感染症対策においても DNA ワクチンの研究は多くなされてきた。魚類のウイルス病であるコイの春ウイルス病<sup>(74)</sup>、IHNV 症<sup>(75)</sup>、VHSV 症<sup>(76)</sup>、ヒラメラブドウイルス症<sup>(77)</sup>、伝染性サケ貧血症<sup>(78)</sup>およびマダイイリドウイルス症<sup>(79)</sup>に対する有効性が報告されている。さらに、2005 年には *M. marinum* 由来の Ag85A 遺伝子を抗原として用いた DNA ワクチンが、hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) の人為的 *M. marinum* 感染に対して有効であることが報告された<sup>(80)</sup>。

日本国では未だ DNA ワクチンの認可はされていないが、2005 年にはカナダ食品検査庁が IHNV 症に対する DNA ワクチンを認可した<sup>(81)</sup>。今後 DNA ワクチンの安全性が確保できれば、我が国においても広く用いられるようになるものと思われる。

## 第6節 *Mycobacterium* 属細菌の主要抗原 Antigen 85 複合体遺伝子

Antigen 85 複合体タンパク質は、*M. tuberculosis* および *M. bovis* の主要分泌産物として見出され、Ag85A<sup>(82)</sup>、Ag85B<sup>(83)</sup>および Ag85C<sup>(84)</sup>の3タイプからなる。*M. tuberculosis* H37Rv の培養上清の精製およびその詳細な解析により、分泌タンパク質中で41%を占める $\alpha$ 抗原の存在が明らかとなった<sup>(85)</sup>。これらは Ag85 複合体であり<sup>(86)</sup>、分子量はそれぞれ31kDa、30kDa および 31.5kDa であり、SDS-PAGE および Western-blotting 解析では Ag85C と Ag85A のバンドがほぼ同様の位置に得られ分離がうまくなされなかったために、他の2つの抗原タンパク質よりも Ag85C の発見は遅れた<sup>(87)</sup>。

Antigen85 複合体は、*Mycobacteria* の細胞溶解液中にはそれほど多く存在せず、細胞表面に結合していることが明らかとなっていた。これらのタンパク質は、ヒトのフィブロネクチン (FN) に対して強い結合性を持っており<sup>(88)</sup>、病原因子として注目されたが、近年ではこの性質が補体レセプター依存的なマクロファージの貪食に関わることが示された<sup>(89)</sup>。Antigen 85 複合体遺伝子は、*Mycobacteria* ゲノム DNA 上でクラスターを構成せずにそれぞれが離れた位置に存在しており<sup>(84), (90)</sup>、carboxylesterase 活性をもつ mycyltranseferase として、mycobacteria の細胞壁生合成の最終段階において、細胞壁構築に関わることが明らかにされた<sup>(91)</sup>。

現在では多くの *Mycobacterium* 属細菌から本遺伝子がクローン化されており<sup>(92), (93)</sup>、本研究室においてもブリ由来の魚病細菌 *Mycobacterium* sp. 9912 株より、Ag85A、Ag85B および Ag85C 遺伝子がクローニングされており<sup>(94)</sup>、Ag85A 遺伝子においては前述の *M. marinum* Ag85A 遺伝子と88%のアミノ酸配列相同性がある。*M. marinum* の事例<sup>(80)</sup>と合わせて、魚類抗酸菌症における本遺伝子群の応用が期待される。

## 第7節 本研究の目的

以上のような背景の下、前述のように、ブリモコバクテリウム感染症に対しての DNA ワクチン開発のため、本研究室ではブリ由来の *Mycobacterium* sp.より Ag85A、Ag85B および Ag85C 遺伝子がクローニングされている<sup>(94)</sup>。また、ヒラメの感染症に対する DNA ワクチンにおいては、種々のサイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-8 および CC ケモカイン 1) 発現ベクターを同時に投与することでアジュバント効果が得られることも証明された<sup>(95)</sup>。これらのことから本修士論文研究では、ブリ由来 *Mycobacterium* sp. 9912 株および 012971 株由来の Ag85 複合体遺伝子を抗原とした DNA ワクチンの効果およびブリ IL-6 遺伝子発現ベクターのアジュバント効果を、感染実験によって評価することを第一の目的とした。

一方で、感染実験のみでのワクチン有効性の評価には充実した飼育設備が必要となることや、特に当研究室においてはブリおよびカンパチの継続した飼育が困難であったことから、より簡便にワクチンの評価を行える実験系の開発が求められた。そこで、Ag85 複合体遺伝子を用いた DNA ワクチン、*M.bovis* BCG 弱毒生ワクチンおよび *Mycobacterium* sp. 012971 株ホルマリン不活化菌体をワクチン候補として用い、遺伝子情報がより蓄積されているヒラメをモデルとして、それらワクチン候補接種後の免疫応答およびワクチン候補接種後 4 週間経過時における抗原液 (*Mycobacterium* sp. 012971 株由来 purified protein derivative) 刺激後の免疫応答を遺伝子レベルで解析することで、ワクチン有効性の評価法を確立することを第二の目的とした。



## 第二章 実験方法

### 第1節 Ag85 複合体遺伝子をコードする DNA ワクチンのブリ属ミコバクテリウム症に対する効果

#### 1. 供試菌株および培養方法

2001 年 10 月に大分県水産試験場にて罹患ブリの腎臓から分離された *Mycobacterium* sp. 012971 株を本実験に用いた。培養は 1% 小川培地（ニッスイ、東京）を用いて 25℃ で行い、継代は 4 週間ごとに行った。

#### 2. 供試魚および飼育方法

##### 2-1. カンパチ

本実験に用いたカンパチ (*Seriola dumerili*) 稚魚は近畿大学より入手し、独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所横須賀庁舎で天然海水により実験に用いるまで飼育した。外部寄生虫の駆除を目的として、魚の導入時に淡水浴を行い、さらに最初の 3 日間は水産用ベネサル（協和発酵、東京）を添付の説明書どおりに、飼料と混合して与えた。

##### 2-2. ブリ

ブリ (*Seriola quinqueradiata*) 稚魚は京都動物検査センターにおいて飼育、保持されていたものを用いた。

### 3. *Mycobacterium* sp. 012971 株（大分県、ブリ）Ag85 複合体遺伝子をコードした DNA ワクチンおよびブリインターロイキン-6 発現プラスミドの作製

#### 3-1. *Mycobacterium* sp. 012971 株からの染色体 DNA の抽出

*Mycobacterium* sp. 012971 株から Ausubel ら（1987）の方法に従い、染色体 DNA の抽出を行った。1% 小川培地上に生育した *Mycobacterium* sp. 012971 株のコロニーを白金耳でかきとり、TE buffer（10mM Tris-HCl [pH8.0]、1mM EDTA）中に加え、ガラスホモジナイザーを用いて均等に分散させた。12,000rpm で 2 分間、室温で遠心分離

して集菌した後、上清を除去し、ニワトリ卵白リゾチーム (10mg/ml) を 10 $\mu$ l、0.1M Tris-HCl [pH8.0] を 10 $\mu$ l、50mM EDTA を 10 $\mu$ l および滅菌蒸留水を 70 $\mu$ l 加え、菌ペレットを十分懸濁して 37℃ で 3 時間インキュベートした。そこへ、TE buffer を 482 $\mu$ l、20% SDS を 15 $\mu$ l および Proteinase K (20mg/ml) を 3 $\mu$ l 加え、60℃ で一晩インキュベートした。次に、5M NaCl を 100 $\mu$ l 加え十分に混合し、CTAB/NaCl 溶液 (10% Cetyltrimethylammonium bromide, 0.7M NaCl) を 80 $\mu$ l 加えてピペティングでよく攪拌した後、65℃ で 10 分間インキュベートした。その後、chloroform:isoamylalcohol (24:1) を等量加え、激しく攪拌してから 13,500rpm で 10 分間、室温で遠心分離した。上清を新しいマイクロチューブに回収し、0.6 倍容の 2-propanol を加え静かに攪拌してから、13,500rpm で 15 分間、4℃ で遠心分離し、上清を除去した。得られた DNA ペレットに 75% エタノール 500 $\mu$ l を加えて洗浄した後、再度 13,500rpm で 5 分間、4℃ で遠心分離し、得られたペレットを 50 $\mu$ l の TE buffer に溶解し、-20℃ で保存した。

溶液中の DNA 濃度は吸光光度計 Gene Quant (Amersham Pharmacia, USA) を用いて定量した。

### 3-2. プリインターロイキン (IL) -6 遺伝子 ORF を含む EST クローンからのプラスミド抽出

プラスミド抽出は、アルカリ-SDS 法で行った。LB/Amp 液体培地 (1% Trypton、0.5% Yeast extract、0.5% NaCl、1% Ampicillin) 2ml にブリ EST クローン YE3\_B03 を植菌し、37℃ で一晩振盪培養した。培養液を 1ml ずつデカンテーションで 1.5ml チューブに移し、5,000rpm、室温で 5 分間遠心分離した。これを 2 回繰り返す、得られた菌ペレットに Solution I (50mM glucose、25mM Tris-HCl [pH8.0]、10mM EDTA [pH8.0]) を 100 $\mu$ l 加え、ボルテックスを用いて完全に懸濁した。そこへ、Solution II -a (2% SDS) および Solution II -b (0.2N NaOH) をそれぞれ 100 $\mu$ l ずつ加え、ゆっくりと混合した後、氷上に 5 分間静置した。続いて、Solution III (3M CH<sub>3</sub>COOK、2M CH<sub>3</sub>COOH) を 150 $\mu$ l 加え、ゆっくりと混合し氷上に 10 分間静置してから、13,500rpm、4℃ で 15 分間遠心分離して上清を 400 $\mu$ l 回収した。次に、400 $\mu$ l の Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol=25:24:1 を加え、激しく混合した後 13,500rpm、4℃ で 10 分間遠心分離して上清を回収し、新しい 1.5ml チューブに移してエタノール沈殿を行った後、得られたペレットを 75%エタノールで洗浄し、乾燥させた。蒸留水を 50 $\mu$ l 加えて DNA を溶解させてから、RNase (終濃度 10 $\mu$ g/ml) を 2 $\mu$ l 加え、37℃ で 1 時間

インキュベートした。その後、2.5M NaClを含んだ 20% PEG 6,000 を 35 $\mu$ l 加え、氷上に 1 時間静置してから、13,500rpm、4℃で遠心分離し、得られたペレットに 30 $\mu$ l の TE buffer を加え完全に溶解した。なお、得られたプラスミド溶液は-20℃で保存した。

### 3-3. Ag85 複合体遺伝子およびブリ IL-6 遺伝子を増幅するためのプライマー設計

本研究室では、既に *Mycobacterium* sp. 9912 株から Ag85 複合体遺伝子がクローニングされており<sup>(94)</sup>、その配列をもとに各遺伝子の PCR 増幅用プライマーを作製した。また、ブリ IL-6 遺伝子についても当研究室でクローニングされていることから、その遺伝子配列をもとにプライマーの作製を行った。各プライマーの 5'-末端には GGG の 3 塩基、および制限酵素認識配列を付加した (Table 1)。

### 3-4. PCR およびアガロースゲル電気泳動

Ag85A、B および C 遺伝子を増幅するため、*Mycobacterium* sp. 012971 株より抽出した染色体 DNA を鋳型として用い、PCR 反応を行った。また、ブリ IL-6 遺伝子の増幅については 2-3 で抽出したプラスミドを鋳型として用いた。反応溶液には、GS- $\gamma$ Taq DNA polymerase を 0.5 $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer (0.1M Tris-HCl [pH8.3]、0.5M KCl、15mM MgCl<sub>2</sub>) を 5 $\mu$ l、2mM dNTP mix (Fermentas、Lithuania) を 5 $\mu$ l、および 10 $\mu$ M に調製した各プライマーを 1 $\mu$ l ずつ PCR チューブに入れ、鋳型 DNA を 1 $\mu$ g となるように加えた後、蒸留水で 50 $\mu$ l までメスアップした。なお、各プライマーの組み合わせは Table 2 に示した。調製した反応液を Mycycler™ (BIO-RAD、USA) にセットし PCR を行った。なお、PCR 反応条件は Table 2 に示した。PCR 産物は 1%アガロースゲルを用い、100V で 30 分間 TAE buffer 中で電気泳動して、ethidium bromide で染色された DNA を Densitograph (ATTO、東京) を用いて可視化した。また、目的サイズの PCR 増幅断片のバンドを切り出し、EASYTRAP™ Ver. 2 (タカラバイオ、滋賀) キットを用いて、添付されているプロトコルに従い、DNA を回収した。

### 3-5. PCR 産物の制限酵素消化

精製した PCR 増幅断片をその両端に存在する制限酵素認識配列を認識する制限酵素で消化した。回収および精製した PCR 産物を全量用いて、各プライマーの組み合わせによる制限酵素 (*Bam*HI、*Eco*RI、*Hind*III および *Xba*I、TOYOBO、大阪) を 5 $\mu$ l および添付の 10 $\times$ buffer を 10 $\mu$ l 加え、蒸留水で 100 $\mu$ l までメスアップしてから、37℃

のインキュベーターで一晩放置した。なお、制限酵素の組み合わせは、Table 1 に示した。その後、Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol=25:24:1 を等量加え激しく振り混ぜた後、12,500rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して、エタノール沈殿により DNA を精製した。

### 3-6. 抗原遺伝子の哺乳類発現ベクターの制限酵素消化

*Mycobacterium* sp. 012971 株の Ag85 複合体遺伝子およびブリ IL-6 遺伝子を魚体内で発現させるために、ヒトサイトメガロウイルス由来のプロモーターをもつ哺乳類発現ベクター pcDNA3.1<sup>(+)</sup> (Invitrogen, USA)、pcDNA3.1<sup>(+)</sup>/myc-His A (Invitrogen, USA)、pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega, USA) を用いた。それぞれの遺伝子断片を消化した制限酵素および 10×buffer を用い、1μg のベクター DNA を 100μl の反応系で 37℃、一晩インキュベートして、完全に消化した。その後、精製したベクター DNA に Alkaline phosphatase calf intestinal (Promega, USA) を 2μl および 10×Alkaline phosphatase buffer (キットに付属) を 5μl 加え、蒸留水で 50μl にメスアップし 37℃で 1 時間インキュベートした。これを再度精製し、次のライゲーション反応に用いた。

### 3-7. ライゲーション反応

3-5 で制限酵素消化した PCR 増幅断片を 100ng、3-6 で調製したベクター DNA を 25ng 用いてライゲーション反応を行った。インサート DNA とベクター DNA を 1.5ml チューブにとり、Ligation-high (TOYOBO, 大阪) をその等量加え、よく混和させてから 4℃で一晩インキュベートした。その後、Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol=25:24:1 抽出およびエタノール沈殿で DNA を精製し、10μl の蒸留水に溶解させた。

### 3-8. コンピテント細胞の作製

コンピテント細胞の調製は、Hanahan らの方法(1991)に従って行った。大腸菌 JM109 株 (タカラバイオ、滋賀) を LB 寒天培地 (1% tripton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% Agar) に植菌して 37℃で一晩培養し、コロニーを単離した。続いて、5ml の 2×YT 液体培地 (1.6% tripton, 1% yeast extract, 0.5% NaCl) に植菌して、37℃で一晩インキュベートした。2×YT 培地が 200ml 入った 500ml の坂口フラスコに前培養した菌液を全量加え、180rpm、37℃で 2 時間振盪培養した。2 時間後から 10 分おきに、紫外可視分光解析システム (DU640, Beckman, USA) を用いて 595nm の波長における吸光

度をモニターした。吸光度が 0.550~0.600 に達するまで培養し、その後氷水中へ移して菌の増殖を停止させた。なお、以後の操作はすべて氷上で行った。菌液をあらかじめ冷やしておいた 500ml の遠心チューブに移し 4,800rpm、4℃で 12 分間遠心分離し上清を除去した。続いて、滅菌した 10%グリセロールを 10ml 加え、ペレットをピペティングで静かに懸濁して、4,800rpm、4℃で 12 分間遠心した。この操作をもう一度繰り返し、最終的に滅菌 10%グリセロール 10ml に懸濁した菌液を得た。これを、あらかじめ氷上で冷却しておいた 1.5ml チューブに 50 $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素中で凍結させた後、使用するまで -80℃で保存した。

### 3-9. コンピテント細胞へのトランスフォーメーション

エレクトロポレーション法を用いて宿主大腸菌へ組換えプラスミドの形質転換を行った。-80℃で保存していたコンピテント細胞を氷上で融解し、そこへ 3-7 で作製した組換えプラスミド溶液を 5 $\mu$ l 加えた。そのうち 50 $\mu$ l を氷上で冷やしておいた 2 mm ギャップのキュベットに移し、200 $\Omega$ 、25 $\mu$ F、2.5kV の条件で電気パルスをかけエレクトロポレーションした。その後直ちに、37℃に温めておいた SOC 培地 (2% tripton、0.5% yeast extract、10mM NaCl、2.5mM KCl、20mM glucose、0.1M MgCl<sub>2</sub>、0.1M MgSO<sub>4</sub>) 1ml をキュベットに加え、ゆっくりとピペティングで攪拌してから 1.5ml チューブに移し、37℃で 30 分間インキュベートした。得られた菌液を、LB/Amp 平板培地 (1.6% tripton、1% yeast extract、0.5% NaCl、1.5% agar、0.01% Ampicillin) に塗抹し、37℃で一晩培養した。

### 3-10. 目的インサート DNA を含む大腸菌のスクリーニング

3-9 で得られたコロニーを 1 クローンずつ爪楊枝でつつき、新しい LB/Amp 平板培地に植え替えてから、PCR チューブの底に塗り付けた。そこへ、GS-rTaq DNA polymerase を 0.3 $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer を 1.5 $\mu$ l、2mM dNTP mix を 1.5 $\mu$ l、および 10 $\mu$ M に調製した各プライマーを 0.3 $\mu$ l ずつ PCR チューブに入れ、蒸留水で 15 $\mu$ l までメスアップした。なお、プライマーの組み合わせは Table 3 に、PCR 反応条件は Table 4 に示した。PCR 反応後、得られた PCR 増幅産物を 1%アガロースゲルで 100V、30 分間電気泳動し、ethidium bromide 染色された目的遺伝子の増幅を Densitograph で可視化し、確認した。また、陽性クローンを LB/Amp 液体培地に植菌して、37℃で一晩培養した後、前述の方法でプラスミドを抽出した。

### 3-11 シークエンス反応

各発現プラスミドのインサート配列を確認するため、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied bio systems、USA) を用いてシークエンス解析を行った。2-10 で得られたプラスミド DNA 300ng を鋳型として用い、BigDye Terminator Ready Reaction Mix を 1 $\mu$ l、5 $\times$ BigDye Sequencing Buffer を 3.5 $\mu$ l および 3.2pmol/ $\mu$ l になるよう希釈したフォワードプライマーまたはリバースプライマーを 1 $\mu$ l を加えた後、蒸留水で 20 $\mu$ l となるようにメスアップした。PCR 反応は Table 4 の条件で行い、プライマーは Table 3 に示した。続いて、PCR 産物を 1.5ml チューブに分注し、125mM EDTA を 5 $\mu$ l、99%エタノールを 60 $\mu$ l 加え、室温で 15 分放置してから、15,000rpm、4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心分離した。得られた DNA ペレットは 75%エタノールで洗浄してから、完全に乾燥させた。精製後、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems、USA) を用いてシークエンス解析を行った。

### 3-12 構築した発現プラスミドの *in vitro* タンパク合成

構築した発現プラスミドのタンパク質発現能を確認するため、TnT Quick coupled transcription/translation systems (Promega、USA) を用いて、*in vitro* でのタンパク合成を行った。0.6ml チューブに 0.5 $\mu$ g の各プラスミドを分注し、1mM Methionine (キットに添付) を 0.5 $\mu$ l、TnT T7 Quick Master Mix (キットに添付) を 20 $\mu$ l、Transcend Biotin-Lysyl-tRNA (Promega、USA) を 2 $\mu$ l 加え、蒸留水で 25 $\mu$ l までメスアップした。これを、30 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートして各タンパク質を合成した。

### 3-13 SDS-PAGE

3-12 の反応液に等量の 2 $\times$ SDS-PAGE sample buffer (0.1M Tris-HCl[pH6.8]、2.5%SDS、20%  $\beta$ -mercaptoethanol、8% triacylglycerol) を加え、沸騰水浴中で 10 分間置き、サンプルの調製を行った。

次に、得られたサンプルを 15%アクリルアミドゲルで電気泳動した。まず、30%アクリルアミド溶液 (30% acryl amide、0.8% bis) を 2.5ml、lower stock (1.5M Tris-HCl [pH8.8]、0.4%SDS) を 1.25ml、蒸留水を 1.25ml、50ml のコーニングチューブにとってから、10%APS を 50 $\mu$ l、TEMED を 5 $\mu$ l 加え、よく攪拌した後ゲル板に全量流し込んだ。続いて、30%アクリルアミド溶液 (30% acryl amide、0.8% bis) を 450 $\mu$ l、upper

stock (0.5M Tris-HCl [pH6.8]、0.4%SDS) を 750 $\mu$ l、蒸留水を 900 $\mu$ l とり、10%APS を 15 $\mu$ l、TEMED を 0.75 $\mu$ l 加えよく攪拌した後、固まった running gel の上に流し込んだ。電気泳動層 (AE-6500 ラピダス・ミニスラブ電気泳動層、ATTO、東京) にゲル板を 2 枚セットして、running buffer (0.04M Tris、0.19M glycine、0.1% SDS) を注ぎ込み、調製しておいたサンプルを 15 $\mu$ l アプライして、PAGEL NPG-520L (ATTO、東京) を用いて 40mA で 90 分間電気泳動した。その後、一方のゲルを Coomassie Brilliant Blue で染色し電気泳動のバンドパターンを確認した。

### 3-14 エレクトロブロッティングによるタンパク質の検出

3-13 で染色しなかったゲルを用いて、エレクトロブロッティングにより各合成タンパク質を検出した。PVDF 膜を 99%エタノールに 20 秒間浸漬してから、転写用バッファー (0.04M Tris、0.19M glycine、0.2% methanol) に浸しておいた 5 枚のフィルター (3mm 濾紙) の上に置いた。それをブロッティング用の機械に乗せ、その上からゲル、さらにフィルターを 5 枚乗せて転写用バッファーを注いだ。ブロッティングは 48mA で 90 分間行い、その後 blocking solution (20mM Tris-HCl [pH7.5]、150mM NaCl、0.5% Tween 20、3%BSA) 中で 1 時間振盪しながらブロッキングを行った。TBST (20mM Tris-HCl [pH7.5]、150mM NaCl、0.5% Tween 20) で 3 回洗浄してから、20ml の TBST に Streptavidin-HRP (キットに添付) を 2 $\mu$ l 加え、この溶液中でメンブレンを 1 時間振盪した。再度 TBST で洗浄してから、3ml の western blue (キットに添付) をメンブレンに滴下し、染色を行った。

## 4. ワクチンの調製および注射法による接種

### 4-1 組換え体プラスミド DNA の大量抽出

構築した各組換え体プラスミド DNA を含む大腸菌を、2ml の LB/Amp 液体培地に植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一晩振盪培養して前培養液とした。これを終濃度 0.01%となるようにアンピシリンを加えた 200ml の 2 $\times$ YT 液体培地に植菌して 37 $^{\circ}$ Cで一晩振盪培養した。培養液を遠心用ボトルに移し、5,000rpm で 10 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心し、上清を除去した。得られた菌ペレットに Solution I を 5ml 加え、ボルテックスおよびピペティングで懸濁してから、Solution II -a および Solution II -b を 5ml ずつ加えて静かに混合し、溶菌させた。そこへ Solution III を 7.5ml 加え、静かに混合させてから、氷上で 10 分間放置し、9,000rpm、4 $^{\circ}$ Cで 15 分間遠心して、上清を注意深く回収した。続いて、13.5ml

のイソプロパノールを加えよく混和させた後、-20℃に 30 分間静置し、7,500rpm、4℃で 15 分間遠心して上清を除去した。得られたペレットを 75%エタノールで洗浄し、風乾させた後、TE buffer を 3ml 加え、溶解し、RNase (10μg/ml) を加え 37℃で 1 時間インキュベートした。

次に、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法でプラスミド DNA を分離した。RNA を分解した 3ml のサンプルに塩化セシウムを 3.88g 入れ、完全に溶解させてから全量を NVT65.2 用超遠心ボトルに移し、エチジウムブロマイド (10mg/ml) を 150μl 加えて、65,000rpm、22℃で 18 時間超遠心した。UV 照射下において、分離されたプラスミドのバンドを 21G ニードルのシリンジで注意深く吸い取り、1.5ml のチューブに分注した。等量の飽和イソプロパノールでエチジウムブロマイドを除去してから、透析チューブに移し、3L の TE buffer 中で 6 時間透析した。TE buffer を交換してさらに一晚透析し、回収した後、DNA 濃度を吸光光度計 Gene Quant を用いて定量した。

一つのプラスミドを 1 尾あたり 25μg 用いて、Phosphate-buffered Saline (PBS) (8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g NaHPO<sub>4</sub>, 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/1L [pH7.4]) で希釈し、DNA ワクチンを調製した。

## 4-2 注射法によるワクチンの接種と供試魚の飼育

### 4-2-1. カンパチへのワクチン接種

2006 年 8 月より、カンパチを供試魚に用いてワクチン接種を行った。本実験には、*Mycobacterium* sp. 9912 株からクローニングされた Ag85 複合体遺伝子を pCI-neo Mammalian Expression Vector に組み込んだ組換え体プラスミド (pCI-Ag85A、B および C) を用いた<sup>(94)</sup>。また、アジュバントとしてブリ IL-6 遺伝子を pCI-neo Mammalian Expression Vector に組み込んだ組換え体プラスミド (pCI-IL-6) を用いた。4-1 で調製したワクチンを 27G ニードルの 1ml シリンジに充填し、供試魚の左側背筋に 100μl 注射して、その後 25℃で適時給餌しながら 4 週間飼育した。なお、ワクチンの組合せおよび試験区は Table 5 のように設定した。

### 4-2-2. ブリへのワクチン接種

2006 年 10 月より、ブリを供試魚としてワクチン接種を行った。本実験には、本節 3 で構築した DNA ワクチン (pcDNA-Ag85A、B および C) およびブリ IL-6 をコードした発現プラスミド (pcDNA-IL-6) を用いた。各プラスミド DNA を 1 尾あたり 25μg



混合し、PBS で希釈してワクチンを調製した。23G ニードルを装着した 1ml シリンジにこれを充填し、供試魚の左側背筋に 100 $\mu$ l 注射した。接種後は 25℃ で 2 日に 1 度魚体重の 2～3% 相当を給餌して飼育した。さらに、ワクチン接種後 2 週間飼育してから、ブースター効果を得るため再度ワクチン接種を行い、さらに 2 週間飼育した。なお、ワクチン接種は Table 6 のような試験区について行った。

## 5. 攻撃試験

### 5-1. 予備攻撃試験

#### 5-1-1. カンパチを用いた予備攻撃試験

カンパチおよびブリに対する *Mycobacterium* sp. 012971 株の LD<sub>50</sub> を簡易的に求めるために予備攻撃試験を行った。

1% 小川培地上に生育した *Mycobacterium* sp. 012971 株を白金耳でかきとり、15mg/ml となるように PBS を加えて、ガラスホモジナイザーで均一になるよう分散させた。この菌液を 10 倍ずつ段階希釈して、15mg/ml～15 $\mu$ g/ml の 4 段階に調製し、27G ニードルを装着した 1ml シリンジに充填した。この菌液 100 $\mu$ l をそれぞれ 5 尾ずつのカンパチに筋肉内投与し、3 週間飼育して、その累積死亡率から簡易的に LD<sub>50</sub> を予測した。なお、攻撃菌数は Middlebrook 7 H10B 平板培地に段階希釈した菌液を塗抹して、培養後計算した。斃死した魚は、解剖後脾臓から菌分離を行い感染を確認した。

#### 5-1-2. ブリを用いた予備攻撃試験

5-1-1 と同様にして、菌湿重量 6mg/ml～6 $\mu$ g/ml に調製した菌液をブリに筋肉内接種し、ブリに対しても簡易的に LD<sub>50</sub> を予測した。

### 5-2 ワクチン接種魚に対する攻撃試験

#### 5-2-1. カンパチに対する攻撃試験

予備攻撃試験によって予測された簡易的 LD<sub>50</sub> の *Mycobacterium* sp. 012971 株を用いて、攻撃試験を行った。75 $\mu$ g/ml の菌液を 100 $\mu$ l、その後、水温 25℃ で適時給餌しながら 3～4 週間飼育して、その累積死亡率を算出した。また、斃死した魚は解剖して脾臓から菌分離を行い、感染を確認した。

#### 5-2-2. プリに対する攻撃試験

5-2-1 と同様にして、プリに対しても攻撃試験を行った。300 $\mu$ g/ml および 150 $\mu$ g/ml の菌液を 100 $\mu$ l ずつ筋肉内投与し、25℃で飽食に給餌しながら 3～4 週間飼育して、その累積死亡率を算出した。また、斃死魚は解剖して、その脾臓から菌分離を行い、感染の確認をした。

## 第 2 節 *Mycobacterium* sp.に対するワクチン接種後のヒラメにおける自然免疫応答

### 1. 供試菌株および培養方法

#### 1-1. *Mycobacterium* sp.

第 1 節 1 と同様の菌株を用いた。

#### 1-2. *Mycobacterium bovis* Bacille de Calmette et Guérin 標準株

本実験では、ワクチン候補として、*Mycobacterium bovis* Bacille de Calmette et Guérin (BCG) を用いた。本菌株は北里大学医療衛生学部滝龍雄准教授より譲り受けた標準株であり、1%小川培地を用いて 37℃ で培養した。

### 2. 供試魚および飼育方法

各ワクチンに対して宿主の引き起こす免疫応答を遺伝子レベルで解析するために、遺伝子情報が蓄積されているヒラメを供試魚とした。日清マリンテック（愛知）より体重 10～16g のヒラメ種苗を入手し、実験に用いるまで 20℃ で適時給餌しながら飼育した。

### 3. ワクチンの調製および注射法による接種およびサンプリング

#### 3-1. DNA ワクチンの調製

当研究室で以前に構築されていた pCI-Ag85A、B および C を用い、第 1 節 4-1 と同様の方法で大量抽出した。一つのプラスミドを 1 尾あたり 25μg 用いて、三種混合、Ag85A、Ag85B および Ag85C の 4 種類を調製した。

#### 3-2. *Mycobacterium* sp. 012971 株ホルマリン死菌の作製

1%小川培地に発育した *Mycobacterium* sp. 012971 株のコロニーを白金耳で掻き取り、菌湿重量で 10mg/ml となるよう PBS 中に懸濁し、ガラスホモジナイザーを用いて均等に分散させた。そのうち、100μl を用い、段階希釈して Middlebrook 7 H10B 平板培地に植菌し、菌数を計算した。次に、ホルマリンを 0.5% となるよう菌懸濁液に加え、25℃ で 48 時間不活化した。不活化した菌体を 7,500rpm で 20 分間、室温で遠心分離し、上清を除去した。PBS でこれを洗浄した後、10mg/ml となるように再度 PBS

を加えて懸濁し、ワクチンとして用いた。また、これを Middlebrook 7 H10B 平板培地に塗抹して不活化を確認した。

### 3-3. BCG ワクチンの調製

1%小川培地で3週間培養した *M. bovis* BCG を 10mg/ml となるように PBS に懸濁して、ガラスホモジナイザーで均一になるように分散させた。菌液を 100 $\mu$ l 用いて、10倍ずつ段階希釈してから Middlebrook 7 H10B 平板培地にプレーティングして培養後菌数を計算した。

### 3-4. 注射法によるワクチンの接種およびサンプリング

以上のように調製したワクチンを 27G ニードルの 1ml シリンジに充填して、ヒラメの左側背筋に 100 $\mu$ l 筋肉注射し、20℃で飽食給餌しながら飼育した。試験区および使用魚数は Table 7 に示した。

ワクチン接種後、1日目、3日目および7日目に、それぞれの試験区から4尾ずつを解剖して腎臓を摘出し、500 $\mu$ l の RNA later (タカラバイオ、滋賀) 中につけて一晩放置した。

## 4. ワクチン接種したヒラメ腎臓からの cDNA 合成

### 4-1. 全 RNA の抽出

RNA later 中で保存しておいたヒラメ腎臓から全 RNA を抽出した。RNA iso (タカラバイオ、滋賀) を 1ml 分注した 2.0ml のマイクロチューブに、採取した腎臓を入れ POLYTRON System PT 1200 E ホモジナイザー (KINEMATICA AG, Switzerland) でホモジナイズし、室温に5分間静置した。そこへ、200 $\mu$ l のクロロホルムを加え、激しく混合して室温で3分間放置し、4℃、15,000rpm で10分間遠心分離した。上層を 500 $\mu$ l 回収して新しい 1.5ml チューブに移し、再度 200 $\mu$ l のクロロホルムを加え、室温に3分間放置してから 4℃、15,000rpm で10分間遠心分離した。上層を新しい 1.5ml チューブに移し、等量のイソプロパノールを加えて転倒混和して、室温に10分間静置した。これを 4℃、15,000rpm で10分間遠心分離し、上清を除去した。得られた RNA ペレットを 1ml の 75%エタノール：15%DEPC 処理水で洗浄し、4℃、10,000rpm で5分間遠心分離して上清を完全に取り除き、30 $\mu$ l の DEPC 処理水に溶解した。RNA 濃度は、吸光光度計 Gene Quant で定量した。

#### 4-2. 全 RNA からの cDNA 合成

4-1 で抽出した全 RNA 2 $\mu$ g を PCR チューブに分注し、そこへ、Oligo (dT) (500 $\mu$ g/ml) を 1 $\mu$ l および 2mM dNTP mix を 5 $\mu$ l 加え、DEPC 処理水で 12 $\mu$ l までメスアップした。これを、65 度で 5 分間熱した後、すぐに氷上へ移し、MMLV RTase (200U/ $\mu$ l) (Invitrogen、USA) を 0.5 $\mu$ l、5 $\times$ First-Strand buffer (キットに添付) を 4 $\mu$ l、0.1M DTT (キットに添付) を 2 $\mu$ l および RNase inhibitor (40U/ $\mu$ l) (TOYOBO、大阪) を 0.25 $\mu$ l、DEPC 処理水を 1.25 $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 50 分間インキュベートし、その後 70 $^{\circ}$ C で 15 分間熱した。ここへ、蒸留水を 80 $\mu$ l 加えて、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

### 5. real-time PCR 法によるヒラメインターロイキン (IL) -1 $\beta$ 、IL-6、Tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ および Myxovirus resistance protein (Mx) mRNA 蓄積量の定量

#### 5-1. real-time PCR 用のプライマー作製

各ワクチン候補接種後 1 日目、3 日目および 7 日目におけるヒラメの自然免疫応答を、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  および Mx の mRNA 蓄積量の変化によって検討するため、定量的 RT-PCR 法による各遺伝子の定量を試みた。各遺伝子および内部標準として用いたリボソーマルプロテイン (RP) -10 の real-time PCR 用プライマーの設計は、primer Express Software Version 3.0 (Applied biosystems、USA) を用いて行い、そのプライマー配列は Table 8 に示した。また、標準曲線の作製に用いるための PCR 産物の増幅には、Table 9 のプライマーセットで増幅したものを鋳型として用いた。

#### 5-2. RT-PCR

Table 9 のプライマーセットを用いて、合成したヒラメ cDNA を鋳型に RT-PCR を行った。4. で合成したヒラメ cDNA を 0.5 $\mu$ l、GS- $\tau$ Taq DNA polymerase を 0.25 $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer を 1.5 $\mu$ l、2mM dNTP mix を 1.5 $\mu$ l、10 $\mu$ M に調製したフォワードプライマーおよびリバースプライマーを 1 $\mu$ l ずつ、PCR チューブに加えて蒸留水で 15 $\mu$ l までメスアップした。これを Mycycler<sup>TM</sup> にセットして、95 $^{\circ}$ C : 5 分の変性後、95 $^{\circ}$ C : 30 秒、55 度 30 秒、72 度 : 30 秒からなる PCR を 28 サイクル行い、72 $^{\circ}$ C 5 分の伸長反応を加えた。PCR 産物は 1%アガロースゲルで 100V、20 分電気泳動し、ethidium bromide により染色された増幅産物のバンドを Densitograph で確認した。また、PCR 産物は

real-time PCR のスタンダードとして用いるため、スピンカラム (Millipore, USA) で、添付のプロトコールに従って精製した。

### 5-3. real-time PCR

Table 8 のプライマーセットを用いて、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 、Mx および RP10 遺伝子の mRNA 蓄積量を real-time PCR 法により相対的に定量した。10 倍希釈したワクチン接種魚の腎臓由来 cDNA を 5 $\mu$ l ずつ 96 穴プレートに分注し、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) を 10 $\mu$ l、10 $\mu$ M に調製したフォワードおよびリバースプライマーを 0.4 $\mu$ l ずつ加え、蒸留水で 20 $\mu$ l までメスアップした。各試薬を分注した後、96 穴プレートをシールして、7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) にセットし、50 $^{\circ}$ C : 2 分、95 $^{\circ}$ C : 10 分の変性の後、95 $^{\circ}$ C : 15 秒、60 $^{\circ}$ C : 1 分からなる PCR を 40 サイクル行い、95 $^{\circ}$ C : 15 秒、60 $^{\circ}$ C : 30 秒、95 $^{\circ}$ C : 15 秒からなる Dissociation stage を加えた。また、データ解析は 7300 system software version 1.3.1 (Applied Biosystems, USA) を用いて行った。

### 第3節 *Mycobacterium* sp. 012971 株由来 purified protein derivative 刺激によるワクチン接種魚の免疫応答

#### 1. 供試菌株および培養方法

##### 1-1. *Mycobacterium* sp.

第1節1と同様の菌株を用いた。

##### 1-2. *Mycobacterium bovis* Bacille de Calmette et Guérin 標準株

第2節1-2と同様の菌株を用いた。

#### 2. 供試魚および飼育方法

第2節2と同様にヒラメを用いた。

#### 3. ワクチンの接種、飼育および PPD による刺激

##### 3-1. DNA ワクチンの調製

第1節3で作製した pcDNA~~mychis~~-Ag85A を第1節4-1と同様にして大量抽出し、1尾あたり 25 $\mu$ g となるように PBS で希釈して DNA ワクチンとした。

##### 3-2. *Mycobacterium* sp. 012971 株ホルマリン死菌の作製

第2節3-2で作製したものをを用いた。

##### 3-3. BCG ワクチンの調製

第2節3-3と同様の方法で BCG ワクチンを調整し、菌数計算を行った。

##### 3-4. 注射法によるワクチンの接種

以上のようにして調製したワクチンを第2節3と同様に、体重 12~16g のヒラメの左側背筋に注射して、25℃で適時給餌しながら4週間飼育した。

#### 4. *Mycobacterium* sp. 012971 株からの purified protein derivative (PPD) の調製

抗原刺激によるワクチン候補接種魚の免疫応答を明らかにするために、

*Mycobacterium* sp. 012971 株培養上清から PPD の調製を行った。1%小川倍地上に生育したコロニーを白金耳でかきとり、200ml の Middle brook 7H 9 液体培地に植菌し、25℃ のインキュベーターで2ヶ月間培養した。これを 105℃ で3時間加温殺菌した後、全量を遠心用ボトルに移し、5,000rpm で15分間遠心分離して菌体を除去した。さらに、上清を NVT65-2 用超遠心チューブに入れ、20,000g で1時間遠心分離した。得られた上清を 200ml のビーカーに回収し、バーナーで緩やかに加熱して、培養上清が 30ml になるまで濃縮した。濃縮液を 50ml のコーニングチューブに移してから、3ml の 40w/v%トリクロロ酢酸を加え、7,500rpm で15分間遠心分離し、可溶性のタンパク質を沈殿させた。沈殿物を 35ml の 4 w/v%トリクロロ酢酸で洗浄し、再度遠心分離してから上清を捨てて 30ml の滅菌 PBS で沈殿を溶解した。得られた溶液を 3L の滅菌 PBS 中で透析し、これを PPD として用いた。タンパク濃度は DU 640 Spectro Photo meter (Beckman、USA) を用いて定量し、その後、-80℃ で保存した。

## 5. ワクチン接種魚に対する PPD 刺激およびサンプリング

ワクチン接種後4週目に、4で調製した PPD を1尾当たり 100 $\mu$ l、左側背筋に注射した。その後、飽食に給餌しながら1日目および3日目にそれぞれの試験区から5尾ずつを解剖して腎臓を摘出し、500 $\mu$ l の RNA later (タカラバイオ、滋賀) 中につけて一晩放置した。

## 6. PPD 刺激したヒラメの腎臓からの cDNA 合成

### 6-1. 全 RNA の抽出

第2節 4-1 と同様の方法で、PPD 刺激したヒラメの腎臓から全 RNA を抽出した。

### 6-2. 全 RNA からの cDNA 合成

第2節 4-2 と同様にして、PPD 刺激したヒラメの腎臓由来の全 RNA から cDNA を合成した。

## 7. real-time PCR 法による IL-1 $\beta$ 、IL-6 および TNF $\alpha$ mRNA 蓄積量の定量

### 7-1. real-time PCR 用のプライマー作製

第2節 5-1 で作製したプライマーを用いた。



## 7-2. RT-PCR

第2節 5-2 と同様にして行った。

## 7-3. real-time PCR

第2節 5-3 と同様にして、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 遺伝子および内部標準としてヒラメ RP-10 遺伝子を用い、real-time PCR を行った。

# 8. cDNA マイクロアレイ法による PPD 刺激したワクチン接種魚の遺伝子発現解析

## 8-1. ヒラメ cDNA マイクロアレイの作製

cDNA マイクロアレイにスポットする遺伝子は、すでに公開されているヒラメ EST 解析<sup>(102), (103), (104), (105), (106), (107)</sup>より得られたクローンおよび当研究室で行われた Poly I:C 刺激したヒラメ頭腎および脳細胞の EST 解析より得られたクローンから、1,937 クローンを選択した。これらを鋳型として用い、PCR にて増幅した。反応液は、鋳型となるプラスミド 5 $\mu$ l に、GS $\pi$ Taq DNA polymerase を 0.25 $\mu$ l、PCR 10 $\times$ buffer を 10 $\mu$ l、2mM dNTP mix を 10 $\mu$ l、100 $\mu$ M に調製したフォワードプライマー（M13-forward; 5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'）およびリバースプライマー（M13-reverse; 5'-AGGAAACAGCTATGACCATGA-3'）を 1 $\mu$ l ずつ加え、蒸留水で 100 $\mu$ l までメスアップして調製した。これを、My cyclor<sup>TM</sup> にセットして 95 $^{\circ}$ C : 5 分の変性後、95 $^{\circ}$ C : 30 秒、55 $^{\circ}$ C : 30 秒、72 $^{\circ}$ C : 2 分からなる PCR を 35 サイクル行い、72 $^{\circ}$ C : 5 分の伸長反応を加えた。得られた PCR 産物 5 $\mu$ l を 1%アガロースゲルで電気泳動し、ethidium bromide で染色された DNA を densitograph で可視化し確認した。その後、残りの PCR 産物を全量 1.5ml チューブに移し、150 $\mu$ l のイソプロパノールを加え、ボルテックスで攪拌してから 4 $^{\circ}$ C に 1 時間放置した。13,500rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離して、得られた DNA ペレットを 75%エタノールで洗浄してから完全に乾燥させた。そこへ、蒸留水 30 $\mu$ l を加えてペレットを溶解し、そのうちの 2 $\mu$ l を再度電気泳動して PCR 産物のバンドを確認した。

cDNA マイクロアレイの作製は、これら精製された PCR 産物をもとに、日本ガイシ株式会社（名古屋）により行われた。

## 8-2. 標識 cDNA の合成および精製

3 で抽出したヒラメ全 RNA から、LabelStar array kit (Qiagen, Germany) を用いて、AA-dUTP 標識 cDNA を合成した。BCG 接種したヒラメ、FKC 接種したヒラメおよび PBS を接種したヒラメの全 RNA を 25 $\mu$ g ずつ分注し、DEPC 処理水で 20 $\mu$ l までメスアップした。65 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした後、急速に氷上で冷却し、10 $\times$  buffer RT (キットに付属) を 5 $\mu$ l、dNTP mix AA (キットに付属) を 5 $\mu$ l、20 $\mu$ M の Oligo-dT プライマーを 5 $\mu$ l、RNase inhibitor (40units/ $\mu$ l、キットに付属) を 0.5 $\mu$ l、LabelStar Reverse Transcriptase (キットに付属) を 2.5 $\mu$ l 加え、蒸留水で 50 $\mu$ l までメスアップした。続いて、これを 37 $^{\circ}$ C で 120 分間インキュベートしてから Stop Solution LS (キットに付属) を 2 $\mu$ l 加え、-20 $^{\circ}$ C で用いるまで保存した。

## 8-3. 標識 cDNA の精製

AA-dUTP 標識 cDNA の精製には、QIAquick PCR Purification Kit を使用した。4-2. で得られた 52 $\mu$ l の cDNA に 260 $\mu$ l の Buffer PB (キットに付属) を加えよく攪拌してからスピнкаラムに移し、13,500rpm、20 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心した。濾液を捨てて、750 $\mu$ l の Buffer PE (キットに付属) を加え 13,500rpm、4 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心した。次に、新しい 1.5ml チューブにスピнкаラムをセットし、そこへ Buffer EB (キットに付属) を 50 $\mu$ l 加えてから室温で 2 分間放置し、13,500rpm、4 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心した。この操作を 2 回繰り返して得た 100 $\mu$ l の溶液に、3M 酢酸ナトリウムを 10 $\mu$ l、20mg/ml Glycogen を 0.5 $\mu$ l、99% エタノールを 250 $\mu$ l 加えて、転倒混和してから、15,000rpm、4 $^{\circ}$ C で 30 分間遠心分離した。得られたペレットを 75% エタノール:25% DEPC 処理水で洗浄し、再度 15,000rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離して、上清を完全に除去した。

## 8-4. カップリング反応

以下の操作はすべて遮光して行った。AA-dUTP 標識 cDNA のペレットに、0.2M Sodium Bicarbonate buffer (pH8.5~9.0) を 9 $\mu$ l 加えてペレットを完全に溶解した。CyDye (Amersham bioscience, England) を無蛍光 DMSO (キットに付属) に溶解させておき、BCG 接種したヒラメ由来の cDNA および FKC 接種したヒラメ由来の cDNA には Cy5 を 1 $\mu$ l、PBS を接種したヒラメ由来の cDNA には Cy3 を 1 $\mu$ l 加え、ボルテックスにて完全に攪拌した。15 分間隔でボルテックスによる攪拌の操作を行いながら、1 時間室温でインキュベートした。

#### 8-5. Cy3 および Cy5 標識 cDNA の精製

以下の操作はすべて遮光して行った。Cy3 および Cy5 標識 cDNA の精製には、LabelStar Clean up Module (Qiagen, Germany) を用いた。標識 cDNA 溶液に蒸留水を 40 $\mu$ l 加え、さらに、Buffer PB (キットに付属) を 300 $\mu$ l 加えて完全に攪拌した。これを、スピncラムに移し 13,500rpm、4℃で 1 分間遠心して濾液を捨てた。そこへ、Buffer LS (キットに付属) を 750 $\mu$ l 加え、13,500rpm、4℃で 1 分間遠心し、上清を除去してから Buffer PE (キットに付属) を 750 $\mu$ l 加えて再度 13,500rpm、4℃で遠心して、上清を除去した。上清を除去してから、フラッシュして完全に濾液を取り除き、スピncラムを新しい 1.5ml チューブに移した。さらに、10 $\mu$ l の Buffer EB (キットに付属) を加え、1 分間室温で放置した後、13,500rpm、4℃で 1 分間遠心した。この操作を 2 回繰り返して得た Cy3 (PBS 接種魚由来) および Cy5 (BCG および FKC 接種魚由来) 標識 cDNA をそれぞれ混合し、Micro Vac MV-100 (TOMY、東京) でドライアップした後、蒸留水を 26 $\mu$ l 加えた。

#### 8-6. ハイブリダイゼーション

以下の操作はすべて遮光して行った。精製した Cy3/Cy5 標識 cDNA に、2 $\times$  formamide hybridization buffer (50% formamide、8 $\times$  SSC、1% SDS、4 $\times$  Denhardt's Solution) を 30 $\mu$ l 加え、80℃で 10 分、65℃で 5 分インキュベートした。これをヒラメ cDNA マイクロアレイのチップ上に全量滴下し、気泡が入らないようにカバーガラスをかけた後、ケースに入れ、42℃で 20 時間インキュベートした。

#### 8-7. ハイブリダイゼーション後の洗浄

以下の操作はすべて遮光して行った。あらかじめ 30℃で保温しておいた洗浄溶液 I (5 $\times$  SSC-0.1% SDS) にハイブリダイゼーションさせた cDNA マイクロアレイチップを 10 分間浸漬させた。洗浄溶液 I 内でスライドガラスを上下に 10 回程度振盪し、よく液をきってから、洗浄溶液 II (0.5 $\times$  SSC) に移し、2 分間浸漬した。先の操作と同様に溶液内でスライドを浸透してから、再度新しい洗浄液 II に移して 2 分間浸漬した。スライドに付着した液をしっかりときってから、洗浄液 III (0.5 $\times$  SSC-0.01% Tween20) 中で 10 回程度振盪した。液を十分にきってから、スライドガラスを 50ml のコーニングチューブに入れ、1,000rpm で 5 分間遠心して、付着していた液を完全に飛ばし、遮光ボックスに移して乾燥させた。

#### 8-8. 蛍光画像のスキャンニングおよびデータ解析

蛍光画像のスキャンニングには、GenePix4000B (Axon instruments, USA) を用いて行い、取り込まれた画像の解析を GenePix Pro ver.4.0 (Axon instruments, USA) で行った。

Table 1 Primers used for PCR amplification of Ag85 complex gene of *Mycobacterium* sp. and IL-6 gene of Yellowtail

Primer name	Sequence	Restriction enzyme
Ag85A-F (pcDNA)	5' -GGGGGATCCACCATGGAGCTTGTTGACAGGTT-3'	<i>Bam</i> HI
Ag85A-R (pcDNA)	5' -GGGGAATTCGTACTAGGCGCCCTGGGTGTCAC-3'	<i>Eco</i> RI
Ag85B-F (pcDNA)	5' -GGGAAGCTTACCATGGCAGACGTGAGCGGGAA-3'	<i>Hind</i> III
Ag85B-R (pcDNA)	5' -GGGCTCGAGCGATCAGGCGGCGCCGAGGCTGG-3'	<i>Xba</i> I
Ag85C-F (pcDNA)	5' -GGGAAGCTTACCATGGAGTTCGTTGAGAAGTT-3'	<i>Hind</i> III
Ag85C-R (pcDNA)	5' -GGGGAATTCCTCAGGCGGCGGAGCGACCG-3'	<i>Eco</i> RI
Ag85A-F ( <i>myc</i> -His)	5' -GGGGGATCCACCATGGAGCTTGTTGACAGGTT-3'	<i>Bam</i> HI
Ag85A-R ( <i>myc</i> -His)	5' -GGGGAATTCGGCGCCCTGGGTGTCACCGGTGTTG-3'	<i>Eco</i> RI
IL-6-F (pcDNA)	5' -GGGAAGCTTAACATGCCCTCTACACACAA-3'	<i>Eco</i> RI
IL-6-R (pcDNA)	5' -GGGGAATTCCTTCACAACCTGAGTTTTAG-3'	<i>Hind</i> III
IL-6-F (pCI-neo)	5' -GGGGAATTCAACATGCCCTCTACACACAA-3'	<i>Eco</i> RI
IL-6-R (pCI-neo)	5' -GGGTCTAGACCTTCACAACCTGAGTTTTAG-3'	<i>Xba</i> I

Table 2 PCR condition for Ag85 complex and IL-6 gene amplification

<b>For Ag85 Complex gene</b>		
<b>1 cycle</b>		
Denaturation	95°C	5 min
<b>35cycles</b>		
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	53°C	30 sec
Extension	72°C	1 min
<b>1 cycle</b>		
Extension	72°C	5 min
<b>For IL-6 gene</b>		
<b>1 cycle</b>		
Denaturation	95°C	5 min
<b>30 cycles</b>		
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	57°C	30 sec
Extension	72°C	1 min
<b>1 cycle</b>		
Extension	72°C	5 min

Table 3 Primers used for colony PCR and Sequencing

Primer name	sequence
<b>For pcDNA3.1<sup>(+)</sup></b>	
pcDNA-F (T7)	5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'
pcDNA-R (BGH)	5' -TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
<b>For pCI-neo</b>	
pCI-neo-F (T7-EEV)	5' -AAGGCTAGAGTACTTAATACGA-3'
pCI-neo-R (T3)	5' -ATTAACCCTCACTAAAGGG-3'

Table 4 PCR condition for colony PCR and sequencing

<b>For colony PCR</b>		
<b>1 cycle</b>		
Denaturation	95°C	1 min
<b>30 cycles</b>		
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	55°C	30 sec
Extension	72°C	1 min
<b>1 cycle</b>		
Extension	72°C	5 min
<b>For sequencing</b>		
<b>1 cycle</b>		
Denaturation	95°C	1 min
<b>25cycle</b>		
Denaturation	95°C	10 sec
Annealing	50°C	5 sec
Extension	60°C	4 min



Table 5 Groups of vaccination for Amberjack

No.	Combination of plasmid DNA	Number of fish
1	Ag85A and IL-6	20
2	Ag85B and IL-6	20
3	Ag85C and IL-6	20
4	Ag85A, Ag85B, Ag85C and IL-6	20
5	Ag85A, Ag85B and Ag85C	20
6	IL-6	20
7	pCI-neo blank vector	20
8	PBS	20

Table 6 Groups of vaccination for Yellowtail

No.	Combination of plasmid DNA	Number of fish
1	Ag85A, Ag85B, Ag85C and IL-6	25
2	Ag85A, Ag85B, Ag85C and IL-6	25
3	pcDNA3.1 <sup>(+)</sup> blank vector	25
4	pcDNA3.1 <sup>(+)</sup> blank vector	25
5	PBS	25
6	PBS	25

Table 7 Groups of Vaccination using Japanese Flounder

No.	Vaccine candidate	Number of fish
1	pCI-Ag85A	12
2	pCI-Ag85B	12
3	pCI-Ag85C	12
4	Ag85A, Ag85B, Ag85C mix	12
5	FKC	12
6	BCG	12
7	pCI-neo blank vector	12
8	PBS	12

Table 8 Primers used for real-time PCR

Primer name	Sequence
IL-1 $\beta$ real-time short-F	5' -CAGCACATCAGAGCAAGACAACA-3'
IL-1 $\beta$ real-time short-R	5' -TGGTAGCACCGGGCATTCT-3'
IL-6 real-time short-F	5' -CAGCTGCTGCAAGACATGGA-3'
IL-6 real-time short-R	5' -GATGTTGTGCGCCGTCATC-3'
TNF $\alpha$ real-time short-F	5' -CGAAGGCCTAGCATTCACTCA-3'
TNF $\alpha$ real-time short-R	5' -TCGTGGGATGATGATGTGGTT-3'
Mx real-time short-F	5' -TGCCAGCCAGCGTCTTG-3'
Mx real-time short-R	5' -GGCGGACTGCTGCAACA-3'
RP-10 real-time short-F	5' -GCTCCTCTGGTGCAGTTTGTGA-3'
RP-10 real-time short-R	5' -TGGTGTTTGCTGGCGTCACTCT-3'

Table 9 Primers used for RT-PCR

Primer name	Sequence
JFIL1b-F	5' -GCAACCGCAAAGTTCTTCTC-3'
JFIL1b-R	5' -AAGATGCTGATCCACGTTCC-3'
JFIL6-RTF	5' -AGGTGACCCCTGACCTTTTA-3'
JFIL6-RTR	5' -CCGTCATCTTCCTGTGGAAA-3'
JFTNFa-RTF	5' -AAATCAGCAGCAGAGCCAAG-3'
JFTNFa-RTR	5' -GGTAGATGGCATTGTACCAG-3'
JFMx2F	5' -AACAGCCAAGGCAAAGATTG-3'
JFMx2R	5' -AATGTCCAGCTCCTCCTTCA-3'
RP10-longF	5' -GGAATTCAACCCAACCTTCTGACGT-3'
RP10-longR	5' -TGGTGCGATCAGGTAGCTAC-3'

## 第三章 実験結果

### 第1節 Ag85 複合体遺伝子をコードする DNA ワクチンのブリ属ミコバクテリウム症に対する効果

#### 1. *Mycobacterium* sp. 012971 株より増幅した Ag85 複合体遺伝子の挿入配列

当研究室において既にクローニングされている *Mycobacterium* sp. 9912 株の Ag85 複合体遺伝子<sup>(94)</sup>の配列をもとに作製したプライマーを用いて PCR を行ったところ、*Mycobacterium* sp. 012971 株からも同遺伝子群の増幅が得られた。これらを pcDNA3.1<sup>(+)</sup>および pcDNA3.1<sup>(+)</sup> myc-His ベクターに組み込み、塩基配列を解析したところ、Ag85A 遺伝子は、Open reading frame (ORF) が 1,014bp で演繹されるアミノ酸配列は 337 アミノ酸からなっていた (Figure 1)。また、Ag85C 遺伝子は ORF が 1,041bp であり、347 アミノ酸をコードしていることが演繹された (Figure 2)。なお、Ag85B 遺伝子については、*Mycobacterium* sp. 9912 株の遺伝子配列と比較し、121bp が欠損した 857bp であり、前半 57 アミノ酸が欠損した 269 アミノ酸からなるタンパク質をコードするものとなっていた (Figure 3)。

#### 2. ブリ IL-6 遺伝子の挿入配列

EST クローン YE3\_B03 から PCR により増幅したブリ IL-6 遺伝子は、pCI-neo Mammalian expression vector および pcDNA3.1<sup>(+)</sup>ベクターに挿入された。この塩基配列を解析したところ、ORF が 660bp で 220 アミノ酸をコードすることが予測された (Figure 4)。

#### 3. 各発現プラスミドからの *in vitro* におけるタンパク質の発現

構築した各プラスミドから抗原遺伝子もしくはブリ IL-6 が発現されることを確認するため、*in vitro* でタンパク質を合成した。反応液を 30℃で 6 時間反応させたところ、pcDNAmychis-Ag85A からは約 39kDa、pcDNA-Ag85A からは約 35kDa、pcDNA-Ag85B からは約 25kDa および pcDNA-Ag85C からは約 39kDa のタンパク質が検出された。また、pcDNA-IL-6 および pCI-IL-6 からはともに約 24kDa のタンパク質が検出された (Figure 5)。

#### 4. カンパチおよびブリを用いた *Mycobacterium* sp.簡易的 50%致死濃度の予測

##### 4-1. カンパチに対する *Mycobacterium* sp. 012971 株感染実験

菌湿重量で 1.5mg、150 $\mu$ g、15 $\mu$ g および 1.5 $\mu$ g の *Mycobacterium* sp. 012971 株は、菌数計算を行ったところ  $4.3 \times 10^8 \sim 10^5$  colony forming units (CFU) であった。これらを 1 試験区 5 尾のカンパチに筋肉内接種し、18 日間飼育したところ、濃度依存的な累積死亡率の変化が見られた (Figure 6)。菌湿重量で 1.5 $\mu$ g の菌を接種した試験区の 18 日目における累積死亡率は 80%であり、それ以外の試験区ではすべての供試魚が斃死した。また、斃死魚脾臓からは *Mycobacterium* sp.を再分離することができた。

##### 4-2. ブリに対する *Mycobacterium* sp. 012971 株感染実験

菌湿重量で 600 $\mu$ g、60 $\mu$ g、6 $\mu$ g および 0.6 $\mu$ g の *Mycobacterium* sp. 012971 株は、菌数計算を行ったところ  $4.9 \times 10^8 \sim 10^5$  CFU であった。これらを、平均体重約 38g のブリ背筋に接種し、20 日間飼育したところ菌濃度に依存的な累積死亡率の変化が見られた (Figure 7)。菌湿重量で 6 $\mu$ g の菌を接種した区の 20 日目における累積死亡率は 40%、0.6 $\mu$ g 接種した区の累積死亡率は 20%であり、それ以外の試験区ではすべての供試魚が斃死した。また、斃死魚の脾臓からは *Mycobacterium* sp.が再分離された。

#### 5. Ag85 複合体遺伝子をコードする DNA ワクチンの有効性

##### 5-1. カンパチにおける pCI-Ag85A、B および C の防除効果とアジュバント pCI-IL-6 の効果

第 1 節 4-1 からカンパチに対する簡易的 LD<sub>50</sub> として算出された菌湿重量 0.75 $\mu$ g の *Mycobacterium* sp. 012971 株は菌数計算したところ、 $5.0 \times 10^5$  CFU であった。これらを注射法でワクチン接種したカンパチおよび対照として PBS、ベクターDNA および pCI-IL-6 を接種したカンパチに筋肉内接種して攻撃したところ、各試験区の 28 日目における累積死亡率は、pCI-Ag85A+pCI-IL-6 区では 92.9%、pCI-Ag85B+pCI-IL-6 区では 93%、pCI-Ag85C+pCI-IL-6 区では 80%となり、対照としたベクターDNA 区では 87.5%、PBS 区では 82.4%、pCI-IL-6 区で 66.7%であった。また、三種混合+pCI-IL-6 区では 94.1%、三種混合区では 82.4%であった (Figure 8)。また、各試験区の斃死魚脾臓からは、*Mycobacterium* sp.が再分離された。

## 5-2. ブリにおける pcDNA-Ag85A、B および C 三種混合ワクチンの防除効果とアジュバント pcDNA-IL-6 の効果

第 1 節 4-2 をもとに設定された菌湿重量  $60\mu\text{g}$  および  $30\mu\text{g}$  の *Mycobacterium* sp. 012971 株の CFU は、 $2.50 \times 10^7$  および  $1.26 \times 10^7$  であった。これらをワクチン接種および対照として PBS およびベクター DNA を接種したブリに筋肉内投与した。菌湿重量  $60\mu\text{g}$  の菌を接種した供試魚の 28 日目における累積死亡率は、三種混合 DNA ワクチン接種区では 90.9% となり、対照としたベクター DNA 接種区では 95.5%、PBS 接種区では 90.9% となった (Figure 9)。また、菌湿重量で  $30\mu\text{g}$  の菌を接種した供試魚の 29 日目における累積死亡率は三種混合 DNA ワクチン接種区では 81.8%、対照としたベクター DNA 接種区では 59.1%、PBS 接種区では 81.8% となった (Figure 10)。なお、各試験区の斃死魚から脾臓を採取し菌分離したところ、*Mycobacterium* sp. が再分離された。



## 第2節 *Mycobacterium* sp.に対するワクチン接種後のヒラメにおける自然免疫応答

### 1. real-time PCR 法による炎症性サイトカイン（IL-1 $\beta$ 、IL-6 および TNF $\alpha$ ）および Mx 遺伝子 mRNA の定量

*Mycobacterium* sp. 012971 株ホルマリン死菌作製に用いた菌湿重量 1mg の菌数は、 $2.0 \times 10^8$  CFU あり、同様に菌湿重量 1mg の標準株 BCG の菌数は  $1.2 \times 10^8$  CFU であった。ワクチンを接種してから 1 日目、3 日目および 7 日目に各試験区から 3 尾ずつを解剖してヒラメ脾臓由来の cDNA を合成した。RP-10 遺伝子を内部標準として real-time PCR 法により各遺伝子 mRNA の相対的な定量を行った。PBS 接種後 1 日目の mRNA 蓄積量を 1 とした時、各遺伝子の mRNA 蓄積量（相対値）を Figure 11~14 に示した。IL-1 $\beta$  遺伝子 mRNA 蓄積量の変化は著しく、BCG 接種後 3 日目で約 12 倍、FKC 接種後 3 日目で約 8 倍に上昇することが確認された。また、BCG 接種区では、1 日目および 7 日目においても約 2 倍の IL-1 $\beta$  遺伝子 mRNA 蓄積量の上昇が見られた（Figure 11）。IL-6 遺伝子についても BCG および FKC 接種後において mRNA 蓄積量の上昇が見られ、BCG 接種後 1 日目に約 2.8 倍、3 日目に 3.2 倍、FKC 接種後 3 日目に約 2.8 倍であった（Figure 12）。TNF $\alpha$  遺伝子の mRNA 蓄積量は BCG 接種区で 3 日目に約 4 倍、7 日目に 3.6 倍に増加し、FKC 接種区では 3 日目に約 3 倍の増加が見られた（Figure 13）。一方で、Mx 遺伝子については PBS 接種後 1 日目と比較した場合、どの試験区においても 2 倍以上の差は見られなかった（Figure 14）。

### 第3節 *Mycobacterium* sp. 012971 株由来 purified protein derivative 刺激によるワクチン接種魚の免疫応答

#### 1. real-time PCR 法による炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-6 および TNF $\alpha$ ) 遺伝子 mRNA の定量

ワクチン候補として pcDNA<sub>mycHis</sub>-Ag85A、FKC および BCG (菌湿重量 1mg、CFU=4.0 $\times$ 10<sup>7</sup>)、また対照として pcDNA3.1 myc-His A ベクターおよび PBS をヒラメに接種し、4週間飼育した。接種後4週目に総タンパク量が 1.75mg/ml の *Mycobacterium* sp. 012971 株由来の PPD を 100 $\mu$ l 接種して1日目および3日目にヒラメを解剖し、その腎臓から cDNA を合成した。それを鋳型 DNA として real-time PCR 法により IL-1 $\beta$ 、IL-6 および TNF $\alpha$  遺伝子の mRNA 蓄積量を相対的に定量した。PPD 刺激後1日目の PBS 区を1とした時、各遺伝子の mRNA 蓄積量を相対的に示したところ、BCG 接種区における IL-1 $\beta$  mRNA の蓄積量は1日目に約7倍、3日目に約3.6倍となり、他の試験区に比べて大きな変動が見られた (Figure 15)。しかし、対照として用いたベクター接種区においても、1日目に約3.2倍の上昇が見られた (Figure 15)。IL-6 遺伝子においては、PPD 刺激後3日目の BCG 接種区で約5倍の mRNA 蓄積量の上昇が見られたが、他の試験区では2倍以上の上昇は見られなかった (Figure 16)。また、TNF $\alpha$  遺伝子 mRNA 蓄積量の上昇も BCG 接種区のみに見られ、1日目に約2.9倍となった (Figure 17)。

#### 2. マイクロアレイ法による BCG および FKC 接種魚の PPD に対する免疫応答の解析

ヒラメ EST 解析のデータ等から得られた 1,937 クローンをスポットしたマイクロアレイチップを用い、第3節1において炎症性サイトカインの mRNA 蓄積量に大きな変化が見られた BCG 接種区の PPD 刺激後1日目および3日目のサンプルについて、PBS 接種区の PPD 刺激後1日目および3日目のサンプルと競合させ、その遺伝子発現パターンを網羅的に解析した。PPD 刺激後1日目においては、解析の対象となったスポット数 1,303 個中、2倍以上の発現上昇を示した遺伝子数は 32 個であり、そのうち、CC chemokine receptor 3 (8.53 倍)、Unknown (5.10 倍)、Equistatin precursor (3.74 倍)、MHC class II-associated invariant chain (3.11 倍)、MHC class II beta (3.10 倍) および DNA polymerase alpha subunit IV (primase)-like protein (3.09 倍) は3倍以上の発現

上昇を示した (Table10)。また、2 倍以上の発現低下が見られた遺伝子数は 185 個であった。同様に、PPD 刺激後 3 日目においては、解析の対象となったスポット数 43 個中、2 倍以上の発現上昇を示した遺伝子数は 5 個であり、そのうち 3 倍以上の発現上昇を示したものは、Ribosomal protein L3 (6.972 倍)、Ribosomal protein L32 (4.303 倍) および Unknown (3.399 倍) であった (Table 10)。また、2 倍以上の発現低下が見られた遺伝子は 28 個であった。

一方で、FKC 接種区の PPD 刺激後 1 日目および 3 日目のサンプルについても、PBS 接種区の PPD 刺激後 1 日目および 3 日目のサンプルと競合させ、その遺伝子発現パターンを網羅的に解析した。FKC 接種区における PPD 接種後 1 日目では、解析の対象となったスポット数 249 個中、2 倍以上の発現上昇を示した遺伝子数は 4 個で、BJ667174 Hypothetical protein のみが 3.65 倍となり 3 倍以上の発現上昇を示した (Table 11)。また、225 個の遺伝子が 2 倍以上の発現低下を示した。同様に、FKC 接種区の PPD 刺激後 3 日目においては、解析の対象となったスポット数 333 個中、2 倍以上の発現上昇を示した遺伝子数は 38 個であり、そのうち 3 倍以上の発現上昇を示したものは 17 個存在した (Table 11)。また、2 倍以上の発現低下を示した遺伝子数は 196 個であった。

10	20	30	40	50	60
ATGGAGCTTGTTGACAGGTTTCGTGGCGCCGTGACGGGTACGTGCGCGCGACTCATGGTG					
M E L V D R F R G A V T G T S R R L M V					
70	80	90	100	110	120
GGAGCCGTTGGCGCGGCCCTGCTATCGGGTCTGGTCGGCTTCGTGCGCGGCTCGGCGACC					
G A V G A A L L S G L V G F V G G S A T					
130	140	150	160	170	180
GCGAGTGCCTTTTCGCGGCCGGGCCTGCCGGTGAATACCTGCAGGTGCCCTCGGTGGCG					
A S A F S R P G L P V E Y L Q V P S V A					
190	200	210	220	230	240
ATGGGCGCAACATCAAGGTCCAGTTCCAAAGCGGTGGCGCCAACCTCTCCGGCGCTGTAC					
M G R N I K V Q F Q S G G A N S P A L Y					
250	260	270	280	290	300
CTGCTGGACGGCATGCGTGCGCAGGACGACTTCAGCGGTTGGGACATCAACACCCCCGCG					
L L D G M R A Q D D F S G W D I N T P A					
310	320	330	340	350	360
TTCGAGTGGTACTACCAGTCGGGCATCTCGGTGCGCCATGCCGGTCGGTGGCCAGTCCAGC					
F E W Y Y Q S G I S V A M P V G G Q S S					
370	380	390	400	410	420
TTCTACTCGGATTGGTACAACCCGGCTTGCGGTAAGGCTGGCTGCACCACTTACAAGTGG					
F Y S D W Y N P A C G K A G C T T Y K W					
430	440	450	460	470	480
GAGACCTTCCTGACCAGCGAGCTGCCGCAGTACCTGTCGGCCAACAACGGTGTCAAGCCC					
E T F L T S E L P Q Y L S A N N G V K P					
490	500	510	520	530	540
ACCGGCAGCGGCGTGGTTGGTCTGTCGATGGCGGGTTCGTGCGGCCCTGATCCTGGCGGCC					
T G S G V V G L S M A G S S A L I L A A					
550	560	570	580	590	600

TACCACCCCGACCAGTTCGTGTACTCCGGCTCGCTGTCCGCACTGCTGGACCCGTGCGAG  
Y H P D Q F V Y S G S L S A L L D P S Q

610 620 630 640 650 660  
GGCATGGGCCCGTCGCTGATCGGCCTGGCCATGGGTGACGCGGGCGGCTACAAGGCTTCC  
G M G P S L I G L A M G D A G G Y K A S

670 680 690 700 710 720  
GACATGTGGGGCCCGAAGGACGACCCGGCCTGGGCGCGTAACGACCCGATGCTTCAGGTC  
D M W G P K D D P A W A R N D P M L Q V

730 740 750 760 770 780  
GGCAAGCTGGTTGCCAACACCCGGATCTGGATGTACTGCGGTAGCGGCAAGCCGTCT  
G K L V A N N T R I W M Y C G S G K P S

790 800 810 820 830 840  
GACCTGGGTGGCGACAACCTGCCCCGGAAGTTCCTGGAGGGCTTCGTCCGGACCAGCAAC  
D L G G D N L P A K F L E G F V R T S N

850 860 870 880 890 900  
ATGAAGTTCCAGGCCGCGTACAACGCTGCCGGTGGCCACAACGCCGTGTGGAACCTTCGAC  
M K F Q A A Y N A A G G H N A V W N F D

910 920 930 940 950 960  
GACAACGGCACGCACAGCTGGGAGTACTGGGGTGGCGAGCTCAACGCTATGAAGCTTGAC  
D N G T H S W E Y W G A Q L N A M K L D

970 980 990 1000 1010 1020  
CTGCAGCACACGCTGGGTGCGACACCCAACACCGGTGACACCCAGGGCGCCTAG  
L Q H T L G A T P N T G D T Q G A \*

Figure 1 Nucleotide sequence of *Mycobacterium* sp. strain 012971 Antigen 85A and predicted amino acid sequence.

10	20	30	40	50	60
TTTCGCGTCCGGGCTTGCCCGTCGAGTACCTGCAGGTGCCATCCGCGGCGATGGGGCGCA					
					M G R S
70	80	90	100	110	120
GCATCAAGGTCCAGTTCCAAAGCGGCGGGACAACCTCGCCTGCGGTCTACCTGCTCGATG					
I K V Q F Q S G G D N S P A V Y L L D G					
130	140	150	160	170	180
GCCTGCGCGCCCAAGACGACTACAACGGCTGGGACATCAACACCCCGCGTTTCGAGTGGT					
L R A Q D D Y N G W D I N T P A F E W Y					
190	200	210	220	230	240
ACTACCAGTCAGGCCTGTCCGTCATCATGCCGGTAGGCGGCCAGTCCAGCTTCTATGCGA					
Y Q S G L S V I M P V G G Q S S F Y A N					
250	260	270	280	290	300
ACTGGTACCAGCCCGCCTGCGGTAAGTCCGGCTGCTCGACCTACAAGTGGGAGACGTTCC					
W Y Q P A C G K S G C S T Y K W E T F L					
310	320	330	340	350	360
TAACCAGCGAACTCCCCGAATGGCTGTCCGCCAATCGCAGCGTCAAGCCCACCGGTAGCG					
T S E L P E W L S A N R S V K P T G S A					
370	380	390	400	410	420
CCGCGATCGGCATCTCGATGTCCGGCTCTTCGGCGATGATCTTGGCGGTGTACCACCCCC					
A I G I S M S G S S A M I L A V Y H P Q					
430	440	450	460	470	480
AGCAGTTCGTGTACGCCGTTTCGCTGTCCGGCGCTGCTGGATCCGTCCCAAGGGATGGGAC					
Q F V Y A G S L S A L L D P S Q G M G P					
490	500	510	520	530	540
CGTCCTTGATCGGCTTGGCAATGGGTGACGCCGAGGCTACAAGGCCGGCGACATGTGGG					
S L I G L A M G D A G G Y K A G D M W G					
550	560	570	580	590	600

GGCCGTCCAGCGATCCCGCCTGGCAGCGCAACGACCCGACGATCCAGATCCCTGCCTTGG																							
P	S	S	D	P	A	W	Q	R	N	D	P	T	I	Q	I	P	A	L	V				
610				620				630				640				650				660			
TCTCCAACAACACCCGCGCTGTGGGTTCACTGCGGCAACGGCACCCCTCCGAACTGGGCG																							
S	N	N	T	R	L	W	V	H	C	G	N	G	T	P	S	E	L	G	G				
670				680				690				700				710				720			
GCGCGAACCTGCCCCGCCGAGTTCCTGGAGAACTTCGTGCGCAGCAGCAACCTGAAGTTCC																							
A	N	L	P	A	E	F	L	E	N	F	V	R	S	S	N	L	K	F	Q				
730				740				750				760				770				780			
AGGACGCCTACAACGCGGCCGGTGGCCACAACGCGGTGTTCAACTTCAACGACAACGGAA																							
D	A	Y	N	A	A	G	G	H	N	A	V	F	N	F	N	D	N	G	T				
790				800				810				820				830				840			
CGCACAGCTGGGAGTACTGGGGCGCACAGCTCAACGCTATGAAGGGCGACTTGCAGGCCA																							
H	S	W	E	Y	W	G	A	Q	L	N	A	M	K	G	D	L	Q	A	S				
850				860																			
GCCTCGGCGCCGCCTGA																							
L	G	A	A	*																			

Figure 2 Nucleotide sequence of *Mycobacterium* sp. strain 012971 Antigen 85B and predicted amino acid sequence.

10	20	30	40	50	60
ATGGAGTTCGTTGAGAAGTTGCGTGGCGCAGCGGCCGGCGCTCCGCGCCGGCTGACCATC					
M E F V E K L R G A A A G A P R R L T I					
70	80	90	100	110	120
GCGGCCATAGGGGCTGCCCTGTTGTCCGGACTTGTTGGGGCCGCGGGTGGCGCGGCGACC					
A A I G A A L L S G L V G A A G G A A T					
130	140	150	160	170	180
GCCGGGGCATTTCAGGCCGGGTCTGCCGGTGAATACCTGCAGATTCCGTCGGCTGCG					
A G A F S R P G L P V E Y L Q I P S A A					
190	200	210	220	230	240
ATGGGCCGCGACATCAAGGTTCAAGTTCAGGGCGGTGGAGCGCACTCGGTCTACCTGCTC					
M G R D I K V Q F Q G G G A H S V Y L L					
250	260	270	280	290	300
GATGGGCTACGGGCGCAGGACGACTACAACGGTTGGGACATCAACACTCCCGCCTTCGAG					
D G L R A Q D D Y N G W D I N T P A F E					
310	320	330	340	350	360
GAGTACTACAACTCCGGGTTGTCCGGTGGTGATGCCCCGTCGGCGGCCAGTCCAGTTTCTAC					
E Y Y N S G L S V V M P V G G Q S S F Y					
370	380	390	400	410	420
AGCGACTGGTACCAGCCCTCTCAGGGCAACGGTCAGGGCTACACCTACAAGTGGGAGACC					
S D W Y Q P S Q G N G Q G Y T Y K W E T					
430	440	450	460	470	480
TTCCTGACCCGGGAGATGCCCCGCTGGTTGCAGGCCAACAAGGGCGTCTCGCCAACCGGC					
F L T R E M P A W L Q A N K G V S P T G					
490	500	510	520	530	540
AATGCGGCGGTGGGCCTTTTCGATGTCGGGCGGTTCGGCGCTTGTTCTGGCTGCCTACTAC					
N A A V G L S M S G G S A L V L A A Y Y					
550	560	570	580	590	600



CCCCAGCAGTTCCCCTACGCCGCGTCCTTGTCGGGATTCTGAACCCCTCCGAGGGCTGG  
P Q Q F P Y A A S L S G F L N P S E G W

610 620 630 640 650 660  
TGGCCGACGCTGATCGGTCTGGCGATGAACGACTCGGGCGGCTACAACGCCAACAGCATG  
W P T L I G L A M N D S G G Y N A N S M

670 680 690 700 710 720  
TGGGGCCCGTCCACTGACCCGGCCTGGAAGCGCAATGACCCGATGGTCCAGATTCCGCGC  
W G P S T D P A W K R N D P M V Q I P R

730 740 750 760 770 780  
TTGGTCGCCAACACACCCGCATCTGGGTCTACTGCGGCAATGGCACCCCCAGCGACCTC  
L V A N N T R I W V Y C G N G T P S D L

790 800 810 820 830 840  
GGTGGCGACAACATGCCGGCGAAGTTCCTGGAAGGCCTGACACTGCGCACCAACCAGACC  
G G D N M P A K F L E G L T L R T N Q T

850 860 870 880 890 900  
TTCCGGGACACCTACCTGGCCTCGGGTGGGCGCAACGGGGTGTTCAACTTCCCGGCCAAT  
F R D T Y L A S G G R N G V F N F P A N

910 920 930 940 950 960  
GGCACTCACTCGTGGCCCTACTGGAACCAGCAGCTGGTTGCCATGAAGGGCGACATCCTC  
G T H S W P Y W N Q Q L V A M K G D I L

970 980 990 1000 1010 1020  
AAGGTGCTCAACGGGCCTGCCGTCCCGGCGGCTCCGGCTGCCCCGGAGGCTCCCGCCGCC  
K V L N G P A V P A A P A A P E A P A A

1030 1040 1050  
CCGGTCGCTCCGGCCGCCTGA  
P V A P A A \*

Figure 3 Nucleotide sequence of *Mycobacterium* sp. strain 012971 Antigen 85C and predicted amino acid sequence.

10	20	30	40	50	60
ATGCCCTCTACACACAATGCCTGCTTGGTCTCTGCAATGATGCTGGCAGCTCTGCTGCTG					
M P S T H N A C L V S A M M L A A L L L					
70	80	90	100	110	120
TGCGGTCTCGGAGCTCCAGTTGAAATTGAGCCCACCAACAGTCCGTCAGGTGACACCTCA					
C G L G A P V E I E P T N S P S G D T S					
130	140	150	160	170	180
GGTGAGGAGGATGGGATGCCCCACTGCCCCCCTGAGTGGCTCCCAGGTTTGGGACTTGATC					
G E E D G M P T A P L S G S Q V W D L I					
190	200	210	220	230	240
ATTAATCAACTCGAAAGTCTCATCAAGGAGGTAGGTGAAGAAGATGGATTCCAAGTAACA					
I N Q L E S L I K E V G E E D G F Q V T					
250	260	270	280	290	300
GAATCTTCTCTGGTCAAATATAAAATCTCCTCACTTCCTGCAAAGTGCCCTAGCTCAAAC					
E S S L V K Y K I S S L P A K C P S S N					
310	320	330	340	350	360
AAGGAACTTGTCTCCGCTGGGTGGCTGAAGGCCTTGAACTTACATGGTTCTTTTAAAG					
K E T C L R W V A E G L E T Y M V L L K					
370	380	390	400	410	420
CATGTGGAGAAGGAGTACCCCAACAGTTCAAGCCTCTCAGAAGTTGGAAACAACAGCCAG					
H V E K E Y P N S S S L S E V G N N S Q					
430	440	450	460	470	480
GGCCTGATCAGCCAGATCAAAGGAGAGATGGGGAAACCTGGCAAGGTCAAAGTGCTGACC					
G L I S Q I K G E M G K P G K V K V L T					
490	500	510	520	530	540
AGCCTCCAGGAGGAGCAGCTGCTGCAGCAGTAAACAACCCTGATGCTTTCCACAGAAGG					
S L Q E E Q L L Q H V N N P D A F H R R					
550	560	570	580	590	600

ATGACCACACTCAGCATCCTGCAGCAACTCCGTCAATTCCTTTGTGATAACAGACGAAAA																													
M	T	T	L	S	I	L	Q	Q	L	R	Q	F	L	C	D	N	R	R	K										
610					620					630					640					650					660				
ATTCGTCAAGTAATGATGCCTAAATATTACAAACAGGGCACTACTAAAACCTCAGTTGTGA																													
I	R	Q	V	M	M	P	K	Y	Y	K	Q	G	T	T	K	T	Q	L	*										

Figure 4 Nucleotide sequence of Interleukin-6 gene of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and predicted amino acid sequence.

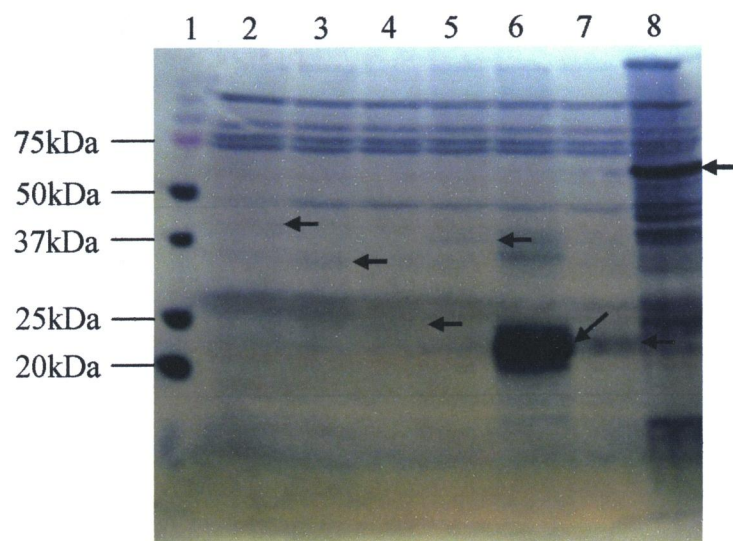


Figure 5 Detection of proteins derived from each expression plasmid by electro-blotting. Arrows indicate putative proteins produced by each plasmid. lane1: marker, lane2: pcDNA<sub>mychis</sub>-Ag85A, lane3: pcDNA-Ag85A, lane4: pcDNA-Ag85B, lane5: pcDNA-Ag85C, lane6: pcDNA-IL-6, lane7: pCI-IL-6, lane8: positive control (derived from Luciferase T7 control DNA)

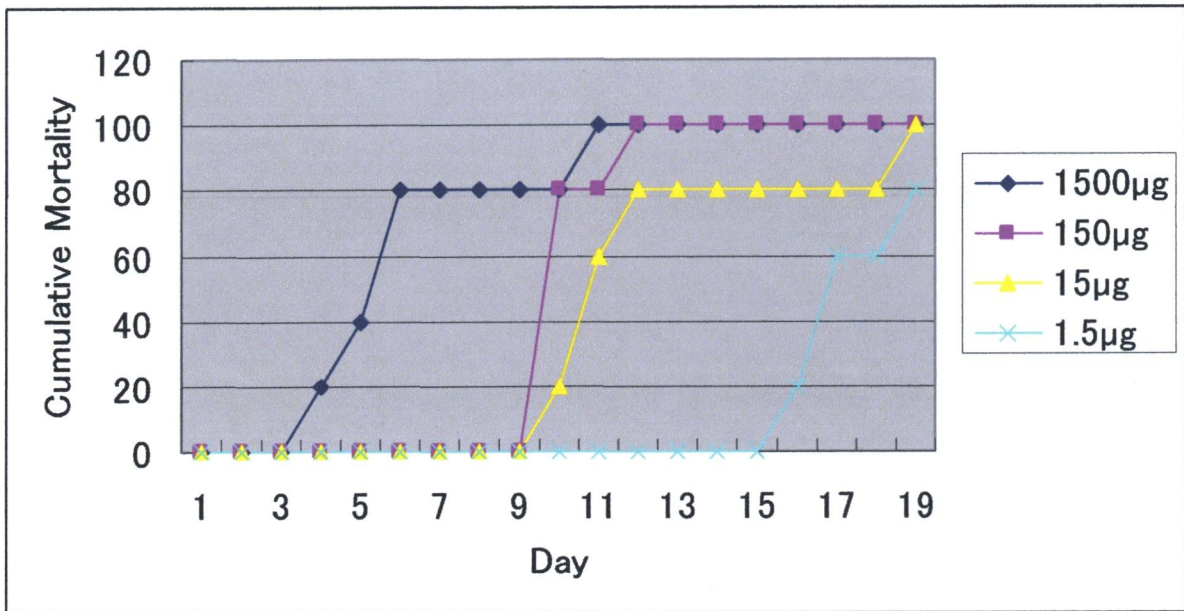


Figure 6 Cumulative mortality curve for amberjack (*Seriola dumerili*) following challenge with live *Mycobacterium* sp. strain 012971. Challenge dose include: 1500µg (diamond), 150µg (square), 15µg (triangle) and 1.5µg (cross).

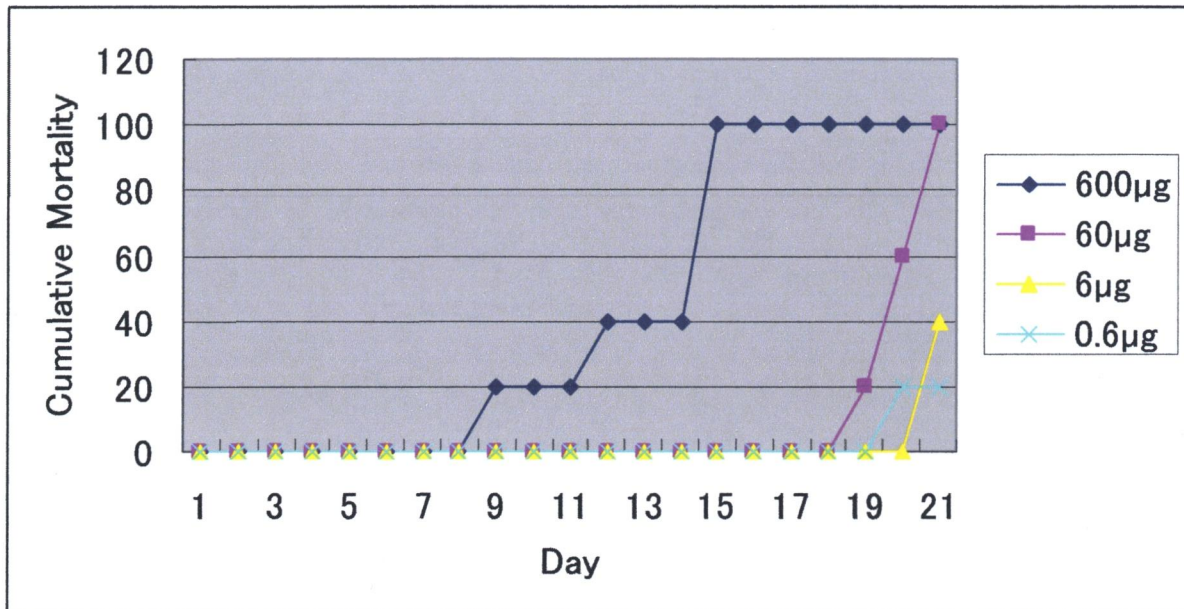


Figure 7 Cumulative mortality curve for Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) following challenge with live *Mycobacterium* sp. strain 012971. Challenge dose include: 600µg (diamond), 60µg (square), 6µg (triangle) and 0.6µg (cross).

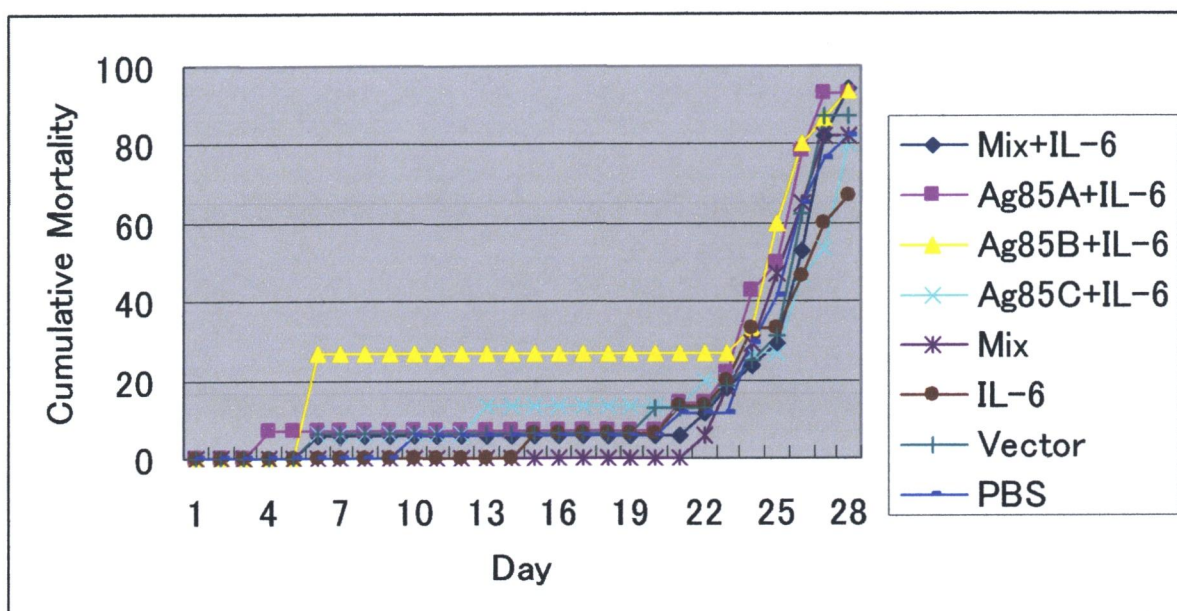


Figure 8 Cumulative Mortality curve for DNA-vaccinated Amberjack (*Seriola dumerili*) challenge with live *Mycobacterium* sp. strain 012971 4 weeks post-vaccination. Vaccination groups include: Mix DNA vaccine + IL-6 (diamond), Ag85A + IL-6 (square), Ag85B + IL-6 (triangle), Ag85C + IL-6 (cross), Mix DNA vaccine (asterisk), IL-6 (circle), blank vector (across line) and PBS (along line).



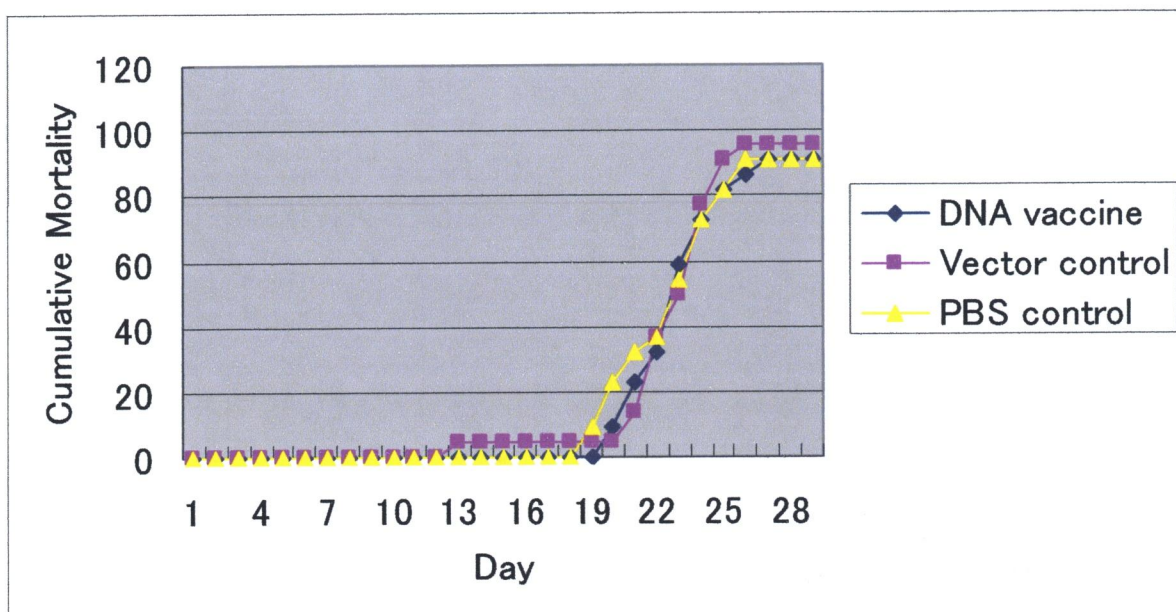


Figure 9 Cumulative Mortality curve for DNA-vaccinated Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) challenge with high-dose (60µg) of live *Mycobacterium* sp. strain 012971 4 weeks post-vaccination. Vaccination groups include: Mix DNA vaccine (diamond), Blank vector (square) and PBS (triangle).



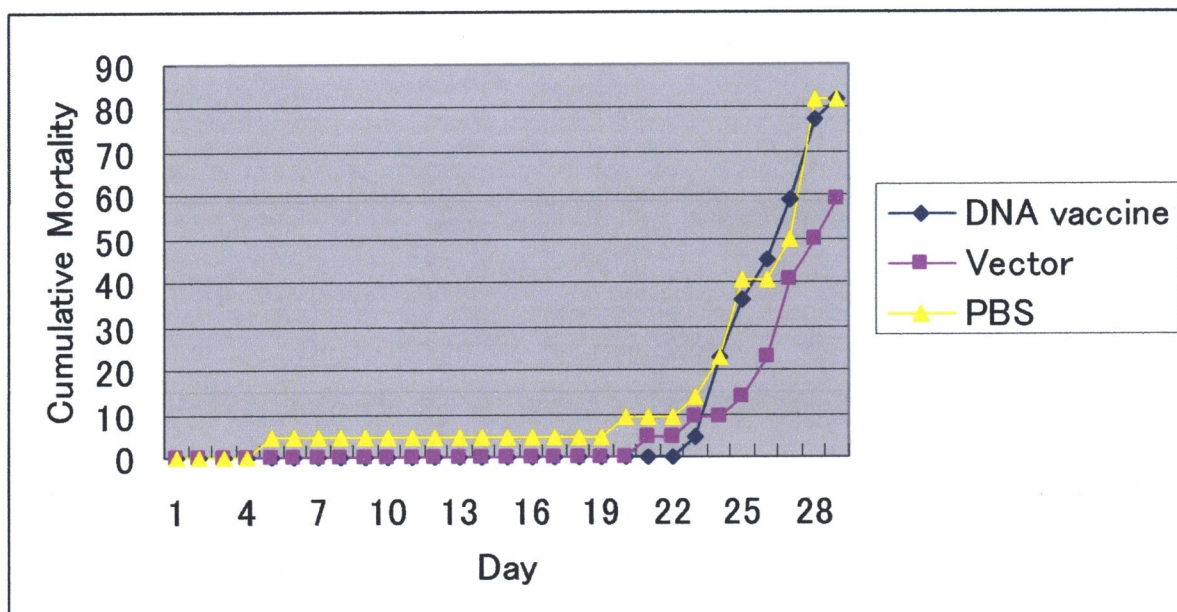


Figure 10 Cumulative Mortality curve for DNA-vaccinated Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) challenge with low-dose (30 $\mu$ g) of live *Mycobacterium* sp. strain 012971 4 weeks post-vaccination. Vaccination groups include: Mix DNA vaccine (diamond), Blank vector (square) and PBS (triangle).

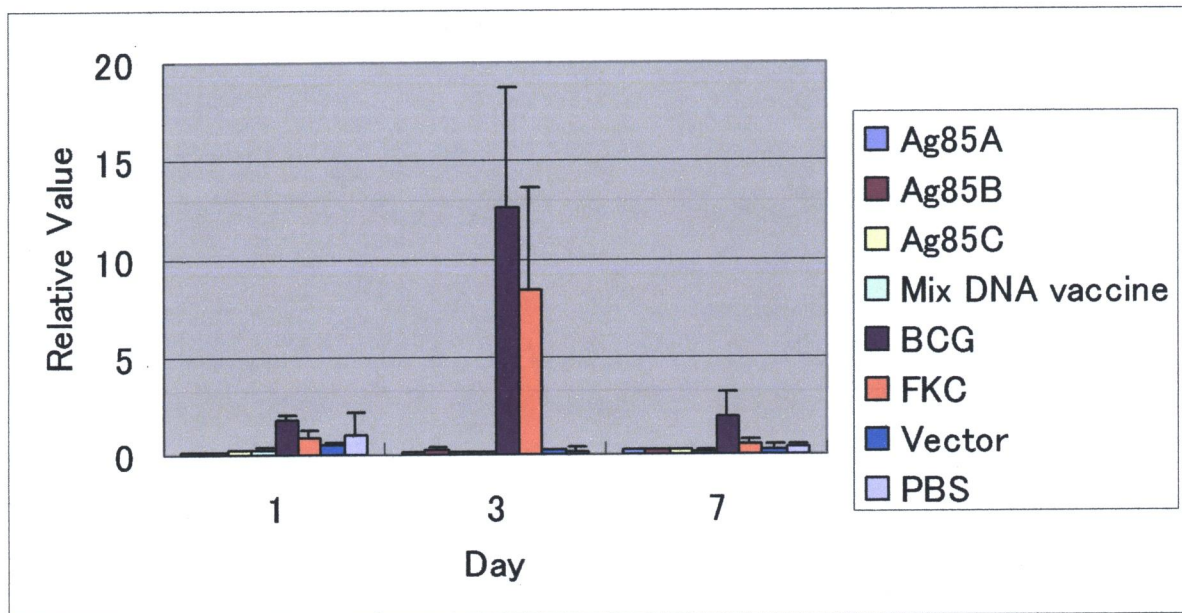


Figure 11 Changes in IL-1  $\beta$  mRNA accumulation on 1, 3 and 7 days after vaccination.

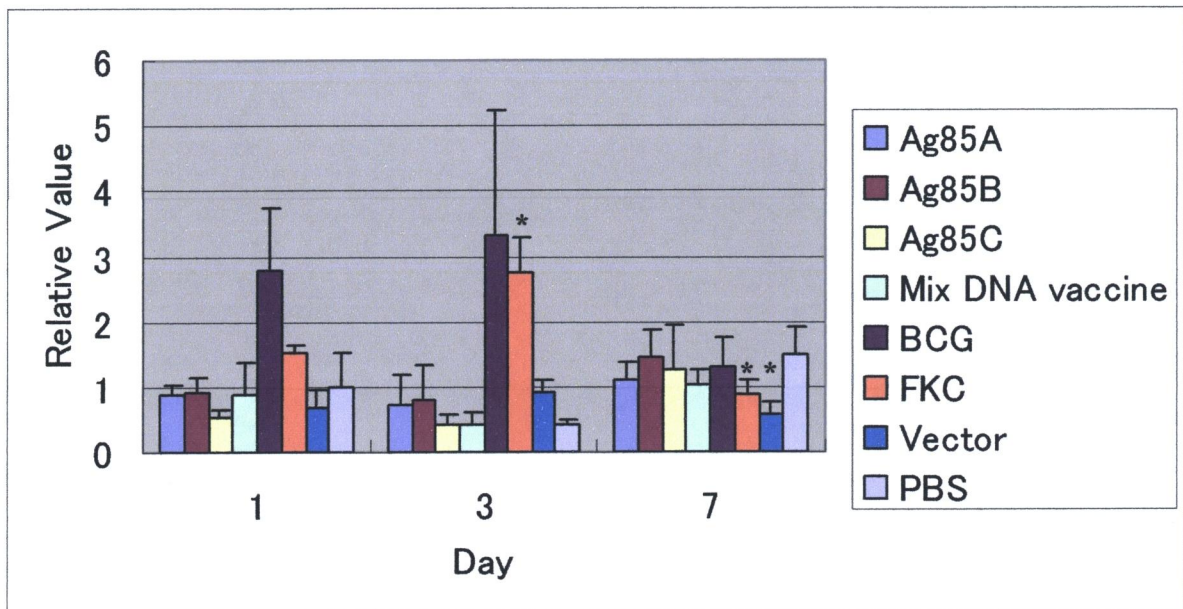


Figure 12 Changes in IL-6 mRNA accumulation on 1, 3 and 7 days after vaccination. \*, T-test at  $P < 0.05$  level of significance were done per sampling point.

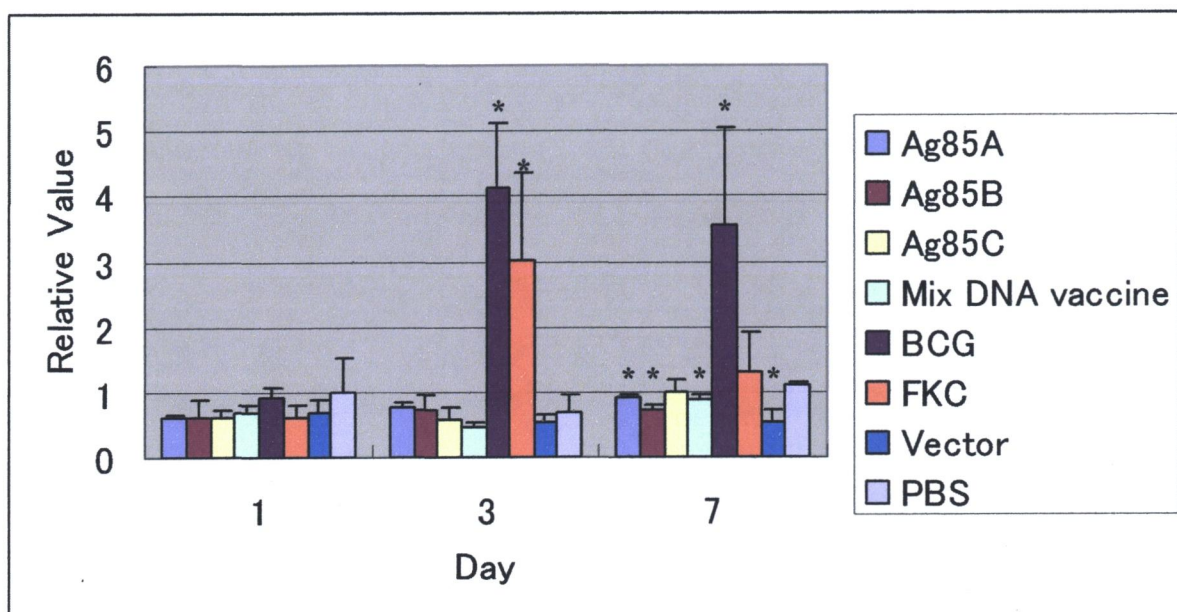


Figure 13 Changes in TNF  $\alpha$  mRNA accumulation on 1, 3 and 7 days after vaccination. \*, T-test at  $P < 0.05$  level of significance were done per sampling point.

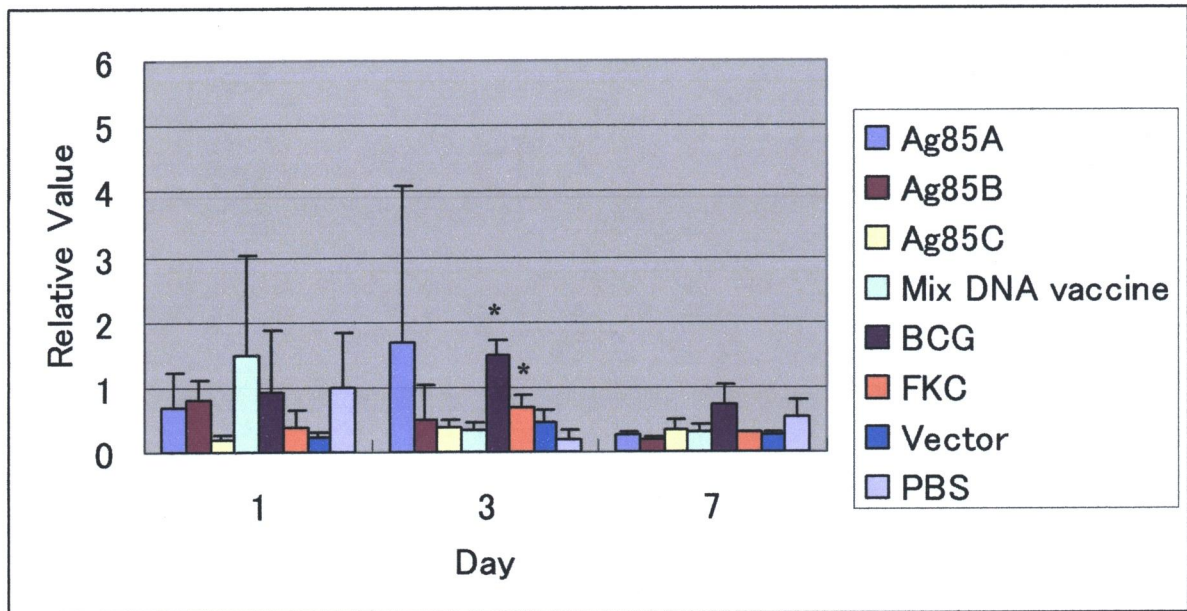


Figure 14 Changes in Mx mRNA accumulation on 1, 3 and 7 days after vaccination. \*, T-test at  $P < 0.05$  level of significance were done per sampling point.



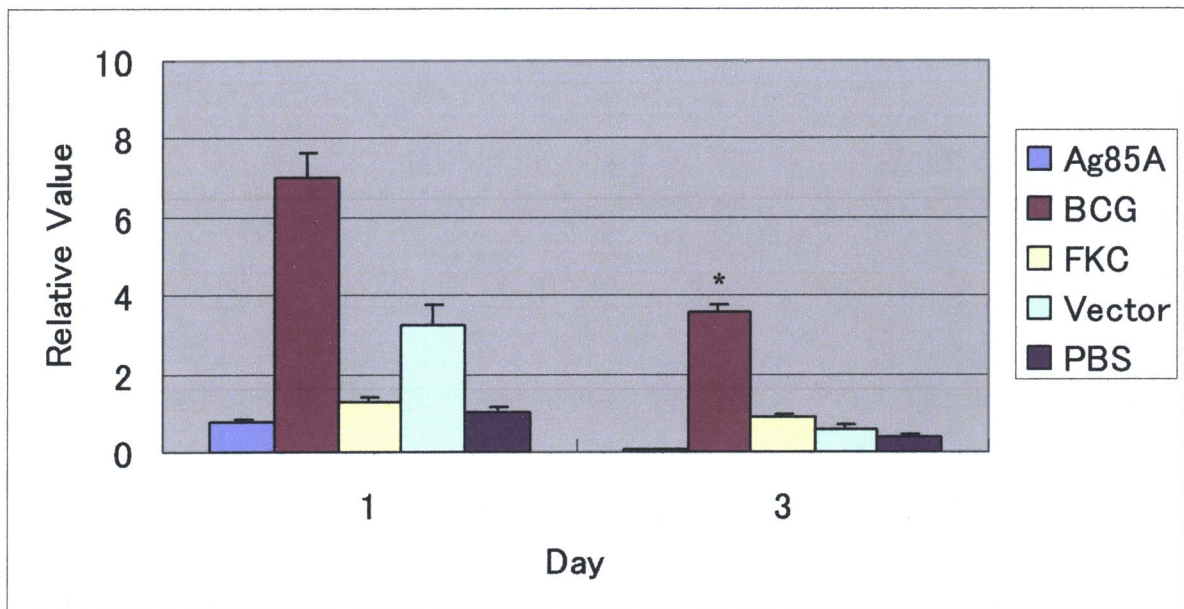


Figure 15 Changes in IL-1  $\beta$  mRNA accumulation by PPD stimulation 4 weeks after vaccination. \*, T-test at  $P < 0.05$  level of significance were done per sampling point.

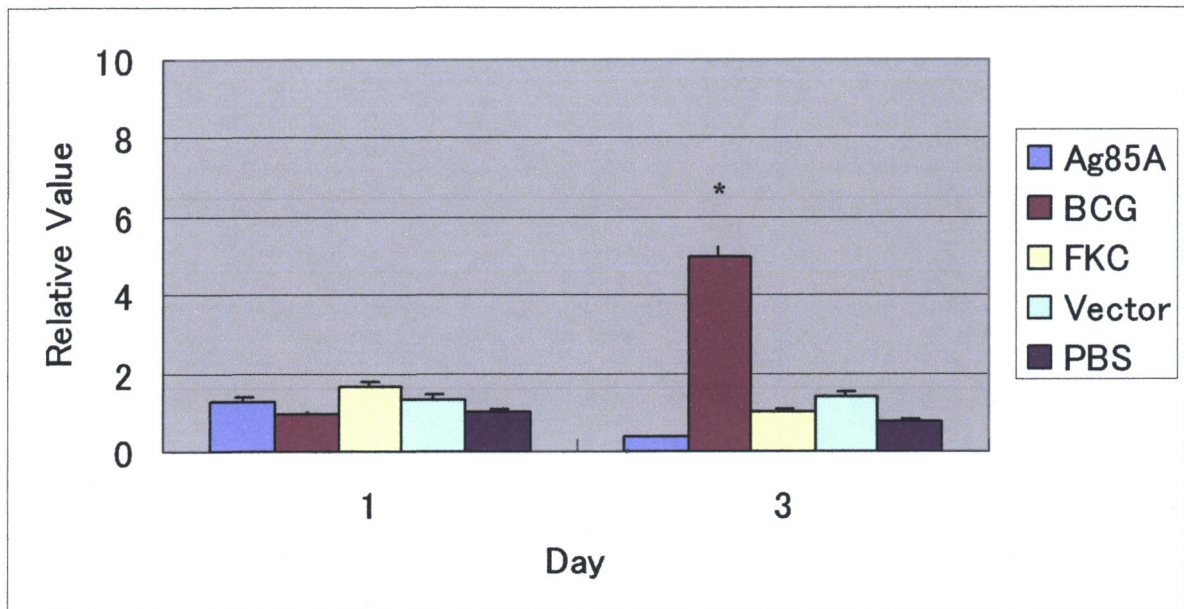


Figure 16 Changes in IL-6 mRNA accumulation by PPD stimulation 4 weeks after vaccination. \*, T-test at  $P<0.05$  level of significance were done per sampling point.

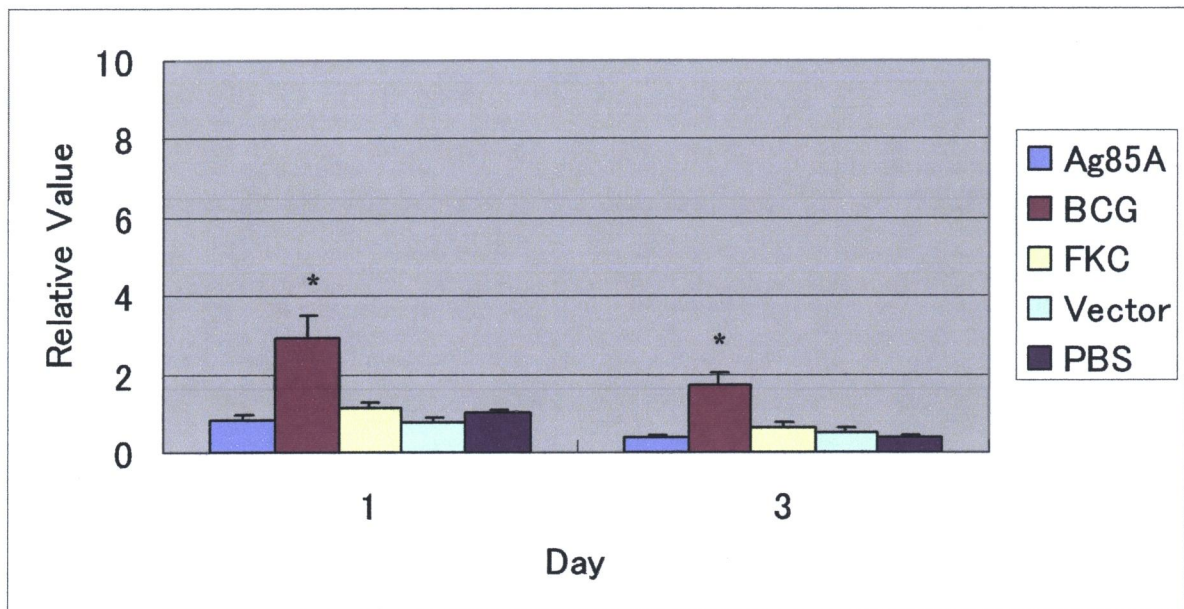


Figure 17 Changes in TNF  $\alpha$  mRNA accumulation by PPD stimulation 4 weeks after vaccination. \*, T-test at  $P < 0.05$  level of significance were done per sampling point.



Table 10 Genes up-regulated by PPD stimulation 4 weeks after BCG vaccination.

Accession No.*	Putative protein product	1 day	3 day
AB081311	CC chemokine receptor 3	8.534	N.D
C23433	Unknown	5.089	N.D
AU260462	Equistatin precursor	3.742	N.D
AU260733	MHC class II-associated invariant chain	3.114	N.D
AU260602	MHC class II beta	3.095	N.D
AU260736	DNA polymerase alpha subunit IV (primase)-like protein	3.086	N.D
C23331	Unknown	2.794	N.D
AU090816	Glycyl tRNA ligase	2.566	N.D
AU091142	Immunoglobulin light chain precursor	2.521	N.D
C23023	Unknown	2.499	N.D
DC620497	Unknown	2.404	N.D
AU260597	MHC class I antigen	2.345	N.D
DC620356	Similar to Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 (Brefeldin A-inhibited GEP 2)	2.321	N.D
AU260914	G protein pathway suppressor 1	2.314	1.704
DC620443	Unknown	2.292	N.D
C23260, C23261	Unknown	2.254	N.D
AU091159	Interferon regulatory factor 4	2.249	N.D
AU260643	Proteasome activator subunit 1	2.238	N.D
DC620218	Hypothetical protein	2.181	N.D
AU050073	Unknown	2.159	1.568
AU260850	Lymphocyte antigen LY-6G.1 precursor	2.151	N.D
DC620091	Unknown	2.15	0.005
AU260490	Unknown	2.126	N.D
DC620467	Hypothetical protein	2.121	N.D
DC620351	Hypothetical protein	2.097	0.047

Accession No.*	Putative protein product	1 day	3 day
CX943227	Unknown	2.086	N.D
DC620518	Unknown	2.069	0.006
AU260778	Unnamed protein product	2.066	N.D
DC619994	Unknown	2.064	N.D
DC620152	Unnamed protein product	2.054	N.D
AU090933	Unknown	2.012	0.002
BAA89033	NADH dehydrogenase subunit-I	2.004	N.D
DC620062	Ribosomal protein L3	0.729	6.972
AU090695	Ribosomal protein L32	1.421	4.303
DC620061	Unknown	N.D	3.399
C82254	Unknown	0.953	2.412
AU090839	Splicing factor	1.761	2.244

\*; DDBJ/EMBL/GenBank accession number

Table 11 Genes up-regulated by PPD stimulation 4 weeks after FKC vaccination.

Accession No.*	Putative protein product	1 day	3 day
DC620567	Hypothetical protein	3.648	N.D
AU090848	Profilin	2.834	N.D
C23331	Unknown	2.437	N.D
DC619957	Unknown	2.337	N.D
AU050047	GS3686, protein kinase inhibitor P58	N.D	32.119
AU050764	ASM-like phosphodiesterase 3a	N.D	31.279
DC620148	Unknown	N.D	29.555
DC619983	Ribosomal protein S7	N.D	14.515
DC620209	Hypothetical protein	N.D	14.202
AU050230	Unknown	N.D	13.961
DC620021	Hypothetical protein CBG15933	N.D	13.917
DC620438	Unknown	N.D	12.799
AU090895	Unknown	N.D	9.317
CX943207	Unknown	N.D	8.040
C81956	B-cell activation protein BL34	N.D	7.822
DC620451	Unknown	0.029	7.632
C82306,C82307	Unknown, immunoglobulin delta	N.D	6.851
BAA89038	ATPase subunit-6	N.D	6.364
AU091270	Invariant chain-like protein 2	N.D	6.288
AU261090	Pyruvate kinase	N.D	6.265
AU091035	Gelatinase B	N.D	5.741
AU260876	Nephrosin precursor	N.D	5.421
AU260914	G protein pathway suppressor 1	N.D	5.343
AU091177	Unknown	N.D	5.066
AU261092	Hypothetical protein FLJ20399Ho	N.D	4.154
AU050476	Ribosomal protein S22	N.D	3.542

Accession No.*	Putative protein product	1 day	3 day
AU091107	Unknown	N.D	3.489
AU091025	Unknown	N.D	3.340
AU090722	Ubiquinol-Cytochrome C reductase core protein II	N.D	3.020
C82026	Dd GPK2	N.D	2.810
AU091142	Immunoglobulin light chain precursor	N.D	2.812
AU261019	Unknown	N.D	2.680
DC620348	Unknown	N.D	2.631
DC620025	Unknown	N.D	2.478
DC620552	Unknown	N.D	2.470
AU050484	Tubulin-folding cofactor D	N.D	2.458
AU261075	Unknown	N.D	2.223
AU090905	Unknown	N.D	2.128
C23405	Microfibril-associated glycoprotein 4	N.D	2.111
C23206, C23207	Unknown	N.D	2.109
AU260927	Unknown	N.D	2.072
AB247498	Interleukin-10	N.D	2.012

\*; DDBJ/EMBL/GenBank accession number

## 第四章 考察

ブリ属のミコバクテリウム症は、発生が確認されて依頼長年に渡り発生し続けており、現在では被害の少なくなったブリ属のレンサ球菌症に変わって、大きな被害の発生が懸念されている<sup>(96)</sup>。しかしながら、本菌の宿主範囲や本菌に対するブリ属魚類の感受性等は詳細に検討されていなかった。カンパチおよびブリに対して *Mycobacterium* sp. 012971 株を用い攻撃試験を行ったところ、両魚種において攻撃菌の菌湿重量依存的な死亡率の変化が見られた (Figure 6、7)。実験に供した魚数、その判定方法は簡易的であるものの、カンパチにおいては攻撃後 19 日目における累積死亡率が菌湿重量 1.5 $\mu$ g 投与区において 80%であったことから、攻撃後 20 日目における LD<sub>50</sub> はその半量程度と考えられた。一方、ブリにおいては、攻撃後 20 日目に累積死亡率が菌湿重量 6 $\mu$ g 投与区で 100%に達したことから、攻撃後 20 日目における LD<sub>50</sub> はその半量程度であると考えられた。また、魚体重など他の要因も関わる事が予想できるが、本菌に対する感受性はカンパチの方がやや高いことが示唆された。

*Mycobacterium* 属細菌による感染症は、様々な生物種で観察されており、魚類においても主に 3 種の病原菌が知られている<sup>(1), (2), (4), (5)</sup>。本研究で用いたブリ由来の *Mycobacterium* sp. は、そのうちの *M. marinum* に近縁とされており<sup>(6)</sup>、Ag85A 遺伝子の両菌種間における相同性が 88%であることから<sup>(94)</sup>、*Mycobacterium* sp. Ag85 複合体遺伝子のブリ属ミコバクテリウム症に対する DNA ワクチンとしての効果が期待されていた。しかしながら、カンパチに対するこれら DNA ワクチンそれぞれの *Mycobacterium* sp. 012971 株に対する防御効果は見られず (Figure 8)、ブースター効果による防御能上昇を試みるも、ブリにおいての効果は確認されなかった (Figure 9、10)。細菌性疾病に対する DNA ワクチンの開発において、一つの難関となるのが、宿主細菌間のコドン使用頻度の差である。生物種によって、用いられるコドンの使用頻度が異なることは 1980 年ごろから明らかにされていた<sup>(97)</sup>。DNA ワクチンは、宿主にそれとは異なる生物種の遺伝子を導入することにより、宿主体内で抗原遺伝子を産生させることで効果をもたらす。ウイルス性感染症の場合には、ウイルスが宿主の転写、翻訳機構を利用して増殖するためコドン使用頻度に差が現れることは少なく、病原微生物側の遺伝子を改変せずに導入しても宿主内での抗原タンパク質生産に大き

な障害はもたらさない。一方、細菌感染症の場合、病原微生物は体内で増殖する際自らの転写、翻訳機構を用いてタンパク質合成を行う。そのため、DNA ワクチンとして抗原遺伝子を改変せずに導入しても宿主側の転写翻訳システムではタンパク質が合成されにくく、防御効果はまったく付与されない場合もある<sup>(98), (99)</sup>。本研究においても構築したプラスミド DNA を 4 $\mu$ g 用い、ウサギ赤血球のライセートによる *in vitro* 転写翻訳キットでタンパク合成した際に、ブリ IL-6 遺伝子の発現量に比較して細菌由来遺伝子の発現量は明らかに少ないものであった (Figure 5)。また、コドン使用頻度を最適化した Ag85B を用いた DNA ワクチンはマウスの *M. tuberculosis* に対する防御効果を上昇させたこと<sup>(99)</sup>からも、Ag85 複合体遺伝子のコドン使用頻度をブリ属魚類に最適化させた DNA ワクチンを用いることでミコバクテリウム症に対する防御効果を示すようになると思われる。

ワクチン有効性は、感染実験による累積死亡率および RPS (relative percent survival) によって評価される場合が多い。本研究においてもこれらの方法を用いたが、供試魚の飼育および維持が困難であり、ブリを用いた実験については京都動物検査センターの協力を得て行うこととなった。このように、特にブリ属魚類を用いて感染実験を行うためには、充実した飼育設備が必要となることから、より簡便にワクチンの有効性を評価できる実験系の確立が求められた。Yasuike らは、HIRRV に対して有効である G-protein を用いた DNA ワクチン (pHRV-G) と効果を示さない N-protein をコードした DNA ワクチン (pHRV-N) 接種によって誘導される遺伝子発現パターンの違いをマイクロアレイ法によって網羅的に解析し、pHRV-G 接種魚では IFN-stimulated gene や Mx 遺伝子の誘導が上昇することを示した<sup>(100)</sup>。このことから、ワクチン候補接種による遺伝子の発現様態を指標とすることでワクチン有効性の評価が可能であることが示唆されていた。そこで、遺伝子情報の蓄積されたヒラメを用いて、自然免疫に関連する炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  および Mx) 遺伝子を標的とし、ワクチン候補接種後の遺伝子発現上昇について解析したところ、BCG および FKC 接種区では IL-1 $\beta$ 、IL-6 および TNF- $\alpha$  の mRNA 蓄積量の上昇が見られた (Figure 11~14)。BCG および FKC は、菌体成分をそのまま保持しているため、細胞壁由来の脂質成分が TLR に認識され、炎症性サイトカインの誘導が起こると考えられる。そのため、その後の獲得免疫への移行が起こりやすいと考えられ、ワクチンとしての有効性も期待できる。しかしながら、各 DNA ワクチン接種魚においては、これら炎症性サイトカインの誘導は見られず、宿主体内での発現量が少ないことがここでも影響し

ていると考えられた。

BCG ワクチンと FKC ワクチンについて効果が期待されたことから、これらのワクチンの *Mycobacterium* sp. に対する獲得免疫付与能について検討することとした。ヒトの肺結核については、結核免疫の有無をツベルクリン反応によって評価する方法が一般的に用いられている。哺乳動物では、IFN- $\gamma$  が結核免疫に関連する重要な遺伝子としてその指標とされ<sup>(101)</sup>、近年では IFN- $\gamma$  の定量によるツベルクリン反応の評価法も確立されている（クオンティフェロン TB-2G. 製造元：Cellestis Ltd. (Australia). 販売元：(株) 日本ビーシージーサプライ）。しかしながら、魚類免疫においては未だ明らかにされていない部分が多く、ヒラメでは IFN- $\gamma$  の報告はなされていない。BCG 接種後のツベルクリン反応時の遺伝子発現について、Tree らは Guinea pig の免疫関連遺伝子のみをスポットしたオリゴマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、その発現パターンを明らかにした<sup>(56)</sup>。それによると、BCG 接種後に PPD を用いて刺激することで TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等の炎症性サイトカインも発現誘導されることが明らかとなり、これらは魚類においても応用可能であると考えられた。そこで、各ワクチン候補接種後に *Mycobacterium* sp.012971 株由来の PPD により刺激し、炎症性サイトカイン（IL-1 $\beta$ 、IL-6 および TNF- $\alpha$ ）の mRNA 蓄積量の変化を real-time PCR 法を用いて定量したところ、BCG 接種魚において各遺伝子 mRNA の蓄積量が上昇することが確認された（Figure 15～17）。このことから、BCG ワクチンは魚類においても細胞性免疫を誘導でき、*Mycobacterium* sp. に対する獲得免疫の付与を宿主にもたすことが可能であると考えられる。また、一般的に死菌ワクチンは細胞性免疫を誘導できないとされるが、本実験結果から魚類においても同様であることが示唆された。

そこで、BCG ワクチン接種魚に対する PPD 刺激時および FKC 接種におけるその際の遺伝子発現パターンを比較することで、ワクチン評価マーカー遺伝子としてより適した分子を探索するために、マイクロアレイ法による網羅的な遺伝子発現解析を行った。BCG 接種魚における刺激後 3 日目および FKC 接種魚における刺激後 1 日目では 2 倍以上に発現上昇している免疫関連遺伝子の解析が行えなかったものの、両者の遺伝子発現パターンは大きく異なることが明らかとなった（Table 10、11）。FKC 接種区においては B 細胞および液性免疫に関連する遺伝子の発現上昇が見られたが、BCG 接種区ではそれに加え、リンパ球やマクロファージ表面に存在しているとされる IRF4（AU091159）、細胞性免疫に関わる MHC class I antigen（AU260597）といった遺伝子の発現上昇が見られた。これらのことは、BCG による細胞性免疫および液性免

疫の付与、FKC による液性免疫の付与が宿主内で起こっていることを強く示唆している。また、BCG 接種区においては、CC chemokine receptor 3 (AB081311) および unknown gene (C23433) が約 5 倍の発現上昇を示していた (Table 10)。これらのことから、これらの遺伝子を *Mycobacterium* sp. に対する有効なワクチン接種時に発現するマーカー遺伝子として用いることが可能であると考えられた。

弱毒菌株をワクチンとして利用することは、環境に流出するという懸念や毒性の復帰による被害の恐れなどから、我が国の水産養殖において流通させることは困難である。しかしながら、BCG ワクチンの有効性は本研究より大きな期待が持たれ、その安全性を証明できれば今後の水産増殖に貢献することができると考えられた。また、本研究で示した BCG の有効性を指標とする新たなワクチン評価法をさらに改良すれば、今後、新規ワクチンを開発する際の重要なツールとして活用できると期待できる。



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京海音洋大学大学院ゲノム科学講座の廣野育生準教授に厚く御礼を申し上げます。また、本修士論文研究の完成は、同ゲノム科学講座の青木宙特任教授ならびに近藤秀裕助教のご助言なくしてはあり得ないものであります。ここに深く感謝の意を申し上げます。

実験供試魚の飼育および維持において多大なるご協力およびご指導を頂きました独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所横須賀庁舎生物特性研究室青野英明室長に深く御礼を申し上げます。また、供試魚の供出および実験の場を与えてくださいました京都動物検査センターの皆様にも深く感謝いたします。

## 参考文献

- (1) Aronson, JD. Spontaneous tuberculosis in salt water fish. *J. Infect. Dis.* 39, 315-320. (1926)
- (2) Ross, AJ, Brancato FP. *Mycobacterium fortuitum* Cruz from the tropical fish *Hyphessobrycon innesi*. *J. Bacteriol.* 78, 392-395. (1959)
- (3) Bruno DW, Griffiths J, Mitchell CG, Wood BP, Fletcher ZJ, Drobniowski FA, Hastings TS. Pathology attributed to *Mycobacterium chelonae* infection among farmed and laboratory-infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.* 33, 101-109. (1998)
- (4) Frerichs GN. Mycobacteriosis: nocardiosis. In: Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR. (Eds.) *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Scientific Publications, 219-235.
- (5) Heckert RA, Elankumaran S, Milani A, Baya A. Detection of a new *Mycobacterium* species in wild striped bass in the Chesapeake Bay. *J Clin Microbiol*, 39, 710-715. (2001)
- (6) 楠田理一, 川上宏一, 川合研児: 養殖ブリから分離された魚類病原性 *Mycobacterium* sp.について. *日本水産学会誌*, 53, 1797-1804. (1987)
- (7) Kusuda R, Kawai K. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish. Pathol.* 33, 221-227. (1998)
- (8) 楠田理一, 井上正彦, 杉浦浩義, 川合研児: 養殖シマアジ病魚から分離された *Mycobacterium* 属細菌の性状. *水産増殖*, 41, 125-131. (1993)
- (9) Ernst JD. Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* Apr. 1998, 1277-1281
- (10) Peyron P, Bordier C, Diaye ENN, Maridonneau-Parini I. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kasasii* by human Neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with Glycosylphosphatidylinositol-Anchored protein. *J. Immun.* 165, 5186-5191. (2000)
- (11) 山本友子: 病原細菌がマクロファージによる貪食と殺菌を回避する機構. *薬学雑誌*, 126, 1235-1243. (2006)
- (12) Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97, 435-447. (1999)

- (13) Tailleux L, Neyroles O, Bouakline SH, Perret E, Sanchez F, Abastado JP, Lagrange PH, Gluckman JC, Rosenzweig M, Herrmann JL. Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J. Immunol.* 170, 1939-1948. (2003)
- (14) Roth MG. Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol. Rev.* 84, 699-730. (2004)
- (15) Nguyen L, Pieters J. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *TRENDS in Cell Biology.* 15,
- (16) 川上宏一, 楠田理一: ブリのコリバクテリウム症原因菌に対する各種化学療法剤の試験管内抗菌作用. *日本水産学会誌*, 55, 2111-2114. (1989)
- (17) 川上宏一, 楠田理一: ブリ実験感染コリバクテリウム症に対するリファンピリン, ストレプトマイシン, ならびにエリスロマイシンの有効性. *日本水産学会誌*, 56, 51-53. (1990)
- (18) 楠田理一: ブリのコリバクテリウム症. *養殖*, 39, 27-28. (2002)
- (19) Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11, 115-122. (1999)
- (20) Jang S, Uematsu S, Akira S, Salgame P. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol*, 173, 3392-3397. (2004)
- (21) Fremont CM, Yermeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, Ryffel B. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin, Invest*, 114, 1790-1799. (2004)
- (22) Salgame P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol*, 17, 374-380. (2005)
- (23) Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol*, 160, 1290-1296. (1998)
- (24) Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci*, 111, 897-905. (1998)

- (25) Hisert KB, Kirksey MA, Gomez JE, Sousa AO, Cox JS, Jacobs WR Jr, Nathan CF, McKinney JD. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* counterimmune (cim) mutants in immunodeficient mice by differential screening. *Infect Immun*, 72, 5315-5321. (2004)
- (26) Talaat AM, Lyons R, Howard ST, Johnston SA. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 4602-4607. (2004)
- (27) Jacobs M, Togbe D, Fremont C, Samarina A, Allie N, Botha T, Carlos D, Parida SK, Grivennikov S, Nedospasov S, Monteiro A, Bert ML, Quesniaux V, Ryffel B. Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. *Microbes Infect*, 9, 623-628. (2007)
- (28) Chan J, Flynn J. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol*, 110, 2-12. (2004)
- (29) Calmette A, H Plots. Protective inoculation against tuberculosis with BCG. *Am Rev Tuberc*, 19, 567-572. (1929)
- (30) Rook GA, JL Stanford. The Koch phenomenon and the immunopathology of tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 215, 239 262. (1996)
- (31) Hart PD. Efficacy and applicability of mass BCG vaccination in tuberculosis control. *Br Med J*, 1, 587 592. (1967)
- (32) Trunz BB, Fine P, Dye C, Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* 367, 1173 1180. (2006)
- (33) Comstock GW, SF Woolpert, VT, Livesay. Tuberculosis studies in Muscogee County, Georgia. Twenty-year evaluation of a community trial of BCG vaccination. *Public Health Rep*, 91, 276 280. (1976)
- (34) Hart PD, I Sutherland. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Br Med J*, 2, 293 295. (1977)
- (35) Sterne J, ALC Rodrigues, IN Guedes. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Int J Tuberc Lung Dis*, 2, 200 207. (1998)
- (36) Brewer TF. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis*, 31(Suppl. 3), S64-67. (2000)

- (37) Colditz GA, TF Brewer, CS Berkey, ME Wilson, E Burdick, HV Fineberg, F Mosteller. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. JAMA 271, 698-702 (1994)
- (38) Doherty TM, Andersen P. Vaccines for tuberculosis: Novel concepts and recent progress. Clin Microb Rev, 18, 687-702. (2005)
- (39) McShane H, Pathan AA, Sander CR, Goonetilleke NP, Fletcher HA, Hill AV, Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. Tuberculosis (Edinb), 85, 47-52. (2005)
- (40) Williams A, Hatch GJ, Clark SO *et al.*. Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. Tuberculosis (Edinb), 85, 29-38. (2005)
- (41) Brandt L, Skeiky Y and Alderson M *et al.*. The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by coadministration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in *M tuberculosis*-infected guinea pigs. Infect Immun, 72, 6622-6632. (2004)
- (42) Dietrich J, Aagaard C, Leah R *et al.*. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. J Immunol, 174, 6332-6339. (2005)
- (43) Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. Proc Natl Acad Sci USA, 97, 13853-13858. (2000)
- (44) 杉田昌彦：結核脂質成分に対する免疫応答の分子機序。日本細菌学会誌，61, 405-413. (2006)
- (45) Porcelli SA. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. Adv Immunol, 59, 1-98. (1995)
- (46) Sugita M, Brenner MB. T lymphocyte recognition of human group 1 CD1 molecules: implications for innate and acquired immunity. Semin Immunol, 12, 511-516. (2000)

- (47) Sugita M, Moody DB, Jackman RM, Grant EP, Rosat JP, Behar SM, Peters PJ, Porcelli SA, Brenner MB. CD1—a new paradigm for antigen presentation and T cell activation. *Clin Immunol Immunopathol*, 87, 8-14. (1998)
- (48) Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature*, 372, 691-694. (1994)
- (49) Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, Bloom BR, Brenner MB, Kronenberg M, Brennan PJ, *et al.* CD1 restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science*, 269, 227-230. (1995)
- (50) Kawasima T, Norose Y, Watanabe Y, Enomoto Y, Narazaki H, Watari E, Tanaka S, Takahashi H, Yano I, Brenner MB, Sugita M. Major CD8 T cell response to live bacillus Calmette-Guerin is mediated by CD1 Molecules. *J Immunol*, 170, 5345-5348. (2003)
- (51) Affronti LF, Seibert, FB. Mycobacterial antigen fractionations. *Am Rev Respir Dis* 92, 1-8. (1965)
- (52) Seibert, F. B. Isolation of three different proteins and two polysaccharides from tuberculin by alcohol fractionation: their chemical and biological properties. *Am Rev Tuberc*, 59, 86-101. (1949)
- (53) 厚生労働省：予防接種法及び結核予防法の一部を改正する法律等の施行について。 (平成六年八月二五日) (健医発第九六一号) (各都道府県知事・各政令市長・各特別区区長あて厚生省保健医療局長通知)。 (1994)
- (54) 新結核用語事典. 日本結核病学会用語委員会 (編) . 財団法人結核予防会 (2001)
- (55) 齋藤紀先：休み時間の免疫学. 講談社サイエンティフィク, (2004)
- (56) Tree JA, Elmore MJ, Javed S, Williams A, Marsh PD. Development of a Guinea pig Immune response-related Microarray and its use to define the host response following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infect Immun*, 74, 1436-1441.
- (57) Taylor J, Paoletti E. Pox viruses as eukaryotic cloning and expression vectors: future medical and veterinary vaccines. *Prog Vet Microbiol Immunol*, 4, 197-217. (1988)

- (58) Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 11478-11482. (1993)
- (59) Barry MA, Lai WC, Johnston SA. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature*, 377, 632-635. (1995)
- (60) Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MA. Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines. *Vaccine*, 12, 1541-1544. (1994)
- (61) Shiver JW, Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. Humoral and cellular immunities elicited by DNA vaccines: Application to the human immunodeficiency virus and influenza. *Adv Drug Deliv Rev*, 21, 19-31. (1996)
- (62) McClements WL, Armstrong ME, Keys RD, Liu MA. Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11414-11420. (1996)
- (63) Doolan DL, Sedegah M, Hedstrom RC, Aguiar JC, Hoffman SL. DNA vaccination against malaria. *Adv Drug Deliv Rev*, 21, 49-61. (1996)
- (64) Fennelly GJ, Khan SA, Abadi MA, Wild TF, Bloom BR. Mucosal DNA vaccine immunization against measles with a highly attenuated *Shigella flexneri* vector. *J Immunol*, 162, 1603-1610. (1999)
- (65) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247, 1465-1468. (1990)
- (66) Restifo NP, Bacik I, Irvine KR, Yewdell JW, McCabe BJ, Anderson RW, Eisenlohr LC, Rosenberg SA, Bennink JR. Antigen processing in vivo and the elicitation of primary CTL responses. *J Immunol*, 154, 4414-4422. (1995)
- (67) Wang R, Epstein J, Charoenvit Y, Baraceros FM, Rahardjo N, Gay T, Banania JG, Chattopadhyay R, de la Vega P, Richie TL, Tornieporth N, Doolan DL, Kester KE, Heppner DG, Norman J, Carucci DJ, Cohen JD, Hoffman SL. Induction in humans of CD8+ and CD4+ T cell and antibody responses by sequential immunization with malaria DNA and recombinant protein. *J Immunol*, 172, 5561-5569. (2004)
- (68) Huygen K. Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect*, 7, 932-938. (2005)

- (69) Liu MA. DNA vaccine: a review. *J Int Med*, 253, 402-410. (2003)
- (70) Silva CL, The potential use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. *Microbes and infection / Institute Pasteur*, 1, 429-435. (1999)
- (71) Morris S, Kelly C, Howard A, Li Z, Collins F. The immunogenicity of single and combination DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine*, 18, 2155-2163. (2000)
- (72) Chambers MA, Vordermeier H, Whelan A, Commander N, Tascon R, Lowrie D, Hewinson RG, Vaccination of mice and cattle with plasmid DNA encoding the *Mycobacterium bovis* antigen MPB83. *Clin Infect Dis an official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 30, S283-S287. (2000)
- (73) Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, Briscoe H, Britton WJ. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 67, 1702-1707. (1999)
- (74) Kanellos T, Sylvester I D, D Mello F, Howard CR, Mackie A, Dixon PF, Chang KC, Ramstad A, Midtlyng , Russell PH. DNA vaccine can protect *Cyprinus carpio* against spring viraemia of carp virus. *Vaccine*, 24, 4927-4933. (2006)
- (75) Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J, Leong JA. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 5, 114-122. (1996)
- (76) Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, Heppell T, Wu T, Davis HL. Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol*, 8, 261-270. (1998)
- (77) Takano T, Iwahori A, Hirono I, Aoki T. Development of a DNA vaccine against hiramé rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish Shellfish Immunol*, 17, 367-374. (2004)
- (78) Mikalsen AB, Sindre H, Torgersen J, Rimstad E. Protective effects of a DNA vaccine expressing the infectious salmon anemia virus hemagglutinin-esterase in Atlantic salmon. *Vaccine*, 23, 4895-4905. (2005)
- (79) Caipang CMA, Takano T, Hirono I, Aoki T. Genetic vaccines protect red seabream, *Pagrus major*, upon challenge with red seabream iridovirus (RSIV) . *Fish Shellfish Immunol*, 21, 130-138. (2006)



- (80) Pasnik DJ, Smith SA. Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine for *Mycobacterium marinum* in fish. *Vet Immunol Immunopathol*, 10, 195-206. (2005)
- (81) Salonius K, Simard N, Harland R, Ulmer JB. The road to licensure of a DNA vaccine. *Curr Opin Investig Drugs*, 8, 635-641. (2007)
- (82) Borremans, M., L. De Wit, G. Volckaert, J. Ooms, J. De Bruyn, Huygen K, Van Vooren JP, Stelandre M, Verhofstadt R, Content J. Cloning, sequencedetermination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 57, 3123-3130. (1989)
- (83) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Yamada T. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular alpha antigen. *J Bacteriol*, 170, 3847-3854. (1988)
- (84) Content J, A de la Cuvelierie, L de Wit, V Vincent-Levy-FrEbault, Ooms J, J De Bruyn. The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are members of a gene family: cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of *M. tuberculosis*. *Infect Immun*, 59, 3205-3212. (1991)
- (85) Fukul Y, Hirai T, Uchida T, Yoneda M. Extracellular proteins of tubercle bacilli. IV. Alpha and beta antigens as major extracellular protein products and as cellular components of a strain (H37Rv) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biken J*, 8, 189-199. (1965)
- (86) Wiker HG, Harboe M, Lea T. Purification and characterization of two protein antigens from the heterogeneous BCG85 complex in *Mycobacterium bovis* BCG. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 81, 298-306. (1986)
- (87) HARALD G, WIKER AND MORTEN HARBOE. The Antigen 85 Complex: a Major Secretion Product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev*, 56, 648-661. (1992)
- (88) Schou C, Yuan Z-L, Andersen B, Bennedsen J. Production and partial characterization of monoclonal hybridoma antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect*, 93, 265-272. (1985)
- (89) Peake P, Gooley A, Britton WJ. Mechanism of interaction of the 85B secreted protein of *Mycobacterium bovis* with fibronectin. *Infect Immun*, 61, 4828-34. (1993)

- (90) Wiker HG, Sletten K, Nagai S, Harboe M. Evidence for three separate genes encoding the proteins of the mycobacterial antigen 85 complex. *Infect Immun*, 58, 272-274. (1990)
- (91) Belisle JT, Vissa VD, Seibert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science*, 276, 1420-1422. (1997)
- (92) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Yamada T. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular alpha antigen. *J Bacteriol*, 170, 3847-3854. (1988)
- (93) Kitaura H, Ohara N, Matsuo T, Tasaka H, Kobayashi K, Yamada T. Cloning, sequencing and expression of the gene for alpha antigen from *Mycobacterium intracellulare* and use of PCR for the rapid identification of *Mycobacterium intracellulare*. *Biochem Biophys Res Commun*, 196, 1466-1473. (1993)
- (94) 高野倫一：魚類病原体に対するDNAワクチンの基礎的研究．東京水産大学大学院 水産学研究科 資源育成学専攻 修士学位論文．(2001)
- (95) Emmadi Dhanwanthari. Adjuvant studies of cytokines in DNA vaccine against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Graduate school of fisheries science Tokyo University of Fisheries Doctoral course of aquatic biosciences. (2004)
- (96) 江草周三 監修, 若林久嗣・室賀清邦 編集:魚介類の感染症・寄生虫病．恒星社 厚生閣．(2004)
- (97) Grantham R, Gautier C, Gouy M, Mercier R, Pavé A. Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res*, 8, r49-r62. (1980)
- (98) Uchijima M, Yoshida A, Nagata T, Koide Y. Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochem Biophys Res Commun*, 261, 445-451. (1999)
- (99) Ko HJ, Ko SY, Kim YJ, Lee EG, Cho SN, Kang CY. Optimization of codon usage enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding Mycobacterial Antigen 85B. *Infect Immun*, 73, 5666-5674. (2005)

- (100) Yasuike M, Kondo H, Hirono I, Aoki T. Difference in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* gene expression profile following hirame rhabdovirus (HIRRV) G and N protein DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol*, 23, 531-541. (2007)
- (101) Madariaga MG, Jalali Z, Swindells S. Clinical utility of interferon gamma assay in the diagnosis of tuberculosis. *J Am Board Fam Med*, 20, 540-547. (2007)
- (102) Inoue S, Nam BH, Hirono I, Aoki T. A survey of expressed genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) liver and spleen. *Mol Mar Bio Biotechnol*, 6, 376-380. (1997)
- (103) Aoki T, Nam BH, Hirono I, Yamamoto E. Sequences of 596 cDNA clones (565.977 bp) of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) leukocytes infected with Hirame rhabdovirus. *Mar Biotechnol*, 1, 477-488. (1999)
- (104) Nam BH, Yamamoto E, Hirono I, Aoki T. A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with Hirame rhabdovirus. *Dev Comp Immunol*, 24, 13-24. (2000)
- (105) Nam BH, Hirono I, Aoki T. Bulk isolation of immune response-related genes by expressed sequence tags of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes stimulated with ConA/PMA. *Fish Shellfish Immunol*, 14, 467-476. (2003)
- (106) Arma, N. R., Hirono, I. and Aoki, T. Characterization of expressed genes in kidney cells of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* following treatment with ConA/PMA and LPS. *Fish Pathol*, 39, 18-196. (2004)
- (107) Arma NR, Hirono I, Aoki T. Identification of genes expressed in the liver of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* by expressed sequence tags. *Fish Sci*, 71, 504-518. (2005)
- (108) Arma NR, Hirono I, Aoki T. Genes expressed in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* spleen: analysis of genes involved in immune function. *Fish Sci*, 71, 1304-1323. (2005)